



# RMN en phase solide biomoléculaire : application à la paroi cellulaire bactérienne et nouvelles approches méthodologiques

Mathilde Giffard

## ► To cite this version:

Mathilde Giffard. RMN en phase solide biomoléculaire : application à la paroi cellulaire bactérienne et nouvelles approches méthodologiques. Sciences pharmaceutiques. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00572605

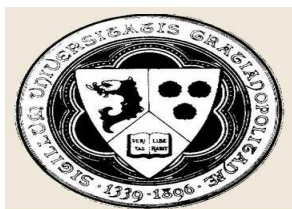
**HAL Id: tel-00572605**

**<https://theses.hal.science/tel-00572605>**

Submitted on 1 Mar 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**  
Spécialité **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

**Mathilde GIFFARD**

le **2 décembre 2010**

---

**RMN en phase solide biomoléculaire : application à la paroi cellulaire bactérienne et nouvelles approches méthodologiques**

**Biomolecular Solid-State NMR: Application to the Bacterial Cell Wall and New Methodological Approaches**

---

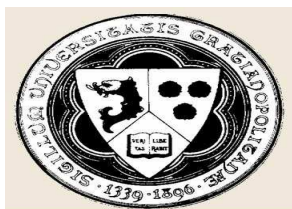
Thèse dirigée par **Michel BARDET** et codirigée par **Sabine HEDIGER**

## JURY

Civilité/Nom/Prénom	Fonction et lieu de la fonction	Rôle
Dr. Michel BARDET	Ingénieur-chercheur, CEA Grenoble	Examineur
Dr. Sabine HEDIGER	Chargée de Recherche, CEA Grenoble	Examinatrice
Dr. Anne LESAGE	Ingénieure de Recherche, CRMN Lyon	Rapporteur
Pr. Dr. Christian BONHOMME	Professeur, Collège de France, Paris	Rapporteur
Pr. Dr. Marc BALDUS	Professeur, U. d'Utrecht, Pays-Bas	Examineur
Pr. Dr. Serge PEREZ	Directeur Scientifique de l'ESRF, Grenoble	Président

Thèse préparée au sein du **Laboratoire de Résonances Magnétiques, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Institut NANosciences et Cryogénie, Direction des Sciences de la Matière, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre de Grenoble dans l'Ecole Doctorale de Chimie Science du Vivant**





# UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**  
Spécialité **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

**Mathilde GIFFARD**

le **2 décembre 2010**

---

**RMN en phase solide biomoléculaire : application à la paroi cellulaire bactérienne et nouvelles approches méthodologiques**

**Biomolecular Solid-State NMR: application to the bacterial cell wall and new methodological approaches**

---

Thèse dirigée par **Michel BARDET** et codirigée par **Sabine HEDIGER**

## JURY

Civilité/Nom/Prénom	Fonction et lieu de la fonction	Rôle
Dr. Michel BARDET	Ingénieur-chercheur, CEA Grenoble	Examineur
Dr. Sabine HEDIGER	Chargée de Recherche, CEA Grenoble	Examinatrice
Dr. Anne LESAGE	Ingénieure de Recherche, CRMN Lyon	Rapporteur
Pr. Dr. Christian BONHOMME	Professeur, Collège de France, Paris	Rapporteur
Pr. Dr. Marc BALDUS	Professeur, U. d'Utrecht, Pays-Bas	Examineur
Pr. Dr. Serge PEREZ	Directeur Scientifique de l'ESRF, Grenoble	Examineur

Thèse préparée au sein du **Laboratoire de Résonances Magnétiques, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Institut NANosciences et Cryogénie, Direction des Sciences de la Matière, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre de Grenoble dans l'Ecole Doctorale de Chimie Science du Vivant**





## Remerciements

---

Je tiens à remercier en premier lieu Michel Bardet et Sabine Hediger d'avoir accepté d'être mes directeur et co-directrice de thèse. Leur aide précieuse m'a été indispensable à l'aboutissement de cette thèse. Merci particulièrement à Sabine pour son encadrement, les heures passées à m'expliquer le fonctionnement d'un spectro, ainsi que tous les autres aspects de la RMN ! Je voudrais également remercier Gaël De Paëpe pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur un aspect très théorique de la RMN et pour son soutien financier en fin de thèse. Merci à eux trois pour leur disponibilité et leur soutien au labo mais aussi en dehors. J'adresse également mes remerciements à Pascale Maldivi pour m'avoir accueillie au sein de son service.

Je remercie chaleureusement les rapporteurs de cette thèse, Anne Lesage et Christian Bonhomme, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce manuscrit et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Un grand merci également à Marc Baldus et Serge Pérez pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient pu aboutir sans la collaboration de l'Institut de Biologie Structurale. Je tiens donc à remercier Jean-Pierre Simorre de m'avoir fait participer au projet portant sur la paroi cellulaire bactérienne, mais aussi Thomas Kern, Catherine Bougault, Ombelline Pessey, Cécile Guistini, Axel Gansmüller, Bernard Joris, Ana Amoroso (de l'université de Liège) et Waldemar Vollmer (de l'université de Newcastle) qui ont également été acteurs de ce projet. Merci également à Jean-Pierre, Beate Bersch et Jacques Covès pour leur don généreux de précieux échantillons de protéines.

Merci également à Józef Lewandowski (du CRMN à Lyon) et à Robert Griffin (du MIT) pour leur collaboration sur le projet de recouplage TSAR.

Je tiens également à remercier l'ensemble du Laboratoire de Résonances Magnétiques et plus particulièrement Guillaume Gerbaud et Laurent Le Pape pour leur amitié.

Merci également à Anaïs et Mélanie, thésardes au SCIB, sans qui je n'aurais jamais été capable de me réinscrire en fac ou de remplir mon dossier de soutenance !

Mes remerciements vont également à mes amis grenoblois qui ont été présents ces trois dernières années : Marion et Virginie pour leur soutien particulier ces deux derniers mois, Loulou, sans qui les soirées et week ends auraient été beaucoup moins drôles, JR pour son grain de folie en fin de soirée, Fournache, pour son accent jurassien inoubliable, Matthieu, pour ses conseils avisés sur les bandes dessinées, les mangas, les films et que sais-je encore !, Jean-Marc et Lucille, même si les soirées chez eux se font rares, Ludo, pour m'avoir supporté sur son canapé et Régis, Dom, Jeannouschka et le petit Eloi, pour les soirées baby-sitting des petits monstres.

Merci également à tous les autres, malgré la distance qui nous séparent (parfois plus de 20 heures d'avion !) : Yuri, Isa, Gwen, Yun, JB, Gaétan, Titi, Boub, Nath, Hélène...

Enfin, un grand merci à toute ma famille, qui a toujours été présente lorsque j'en avais besoin, en particulier mes parents et ma sœur. Merci aussi à Marthe de s'être déplacée de Toulouse pour m'aider à la préparation du pot de thèse !

# Table des matières

---

Remerciements .....	5
Abréviations et sigles utilisés .....	13
Introduction générale .....	17

<p><b>Partie I : Etude de la paroi cellulaire bactérienne par RMN en phase solide</b></p>
---

<b>1. La paroi cellulaire bactérienne .....</b>	<b>31</b>
1.1 Le peptidoglycane.....	32
1.1.1 <i>Composition chimique du peptidoglycane</i> .....	33
1.1.1.1 La chaîne de glycanes .....	33
1.1.1.2 Les chaînes peptidiques.....	34
1.1.1.3 Réticulation et ponts interpeptidiques.....	36
1.1.2 <i>Propriétés biophysiques du peptidoglycane</i> .....	37
1.1.3 <i>Structure tridimensionnelle du peptidoglycane</i> .....	38
1.1.3.1 Le modèle « superposé » .....	39
1.1.3.2 Le modèle « en échafaudage » .....	40
1.1.4 <i>Le peptidoglycane, le système immunitaire et les antibiotiques</i> .....	41
1.2 Les acides téichoïques.....	42
1.2.1 <i>Composition chimique des acides téichoïques</i> .....	42
1.2.2 <i>Rôle des acides téichoïques au sein de la bactérie</i> .....	44
1.2.2.1 Pathogénicité des acides téichoïques.....	44
1.2.2.2 Homéostasie et assimilation des cations métalliques.....	45
<b>2. Caractérisation de la paroi cellulaire bactérienne et de ses interactions avec les cations métalliques .....</b>	<b>49</b>
2.1 Caractérisation de la paroi cellulaire bactérienne .....	49
2.1.1 <i>Caractérisation du peptidoglycane de B. subtilis et S. aureus</i> .....	50
2.1.1.1 Préparation des échantillons.....	50
2.1.1.2 Attribution du peptidoglycane.....	51

2.1.1.3	Caractérisation de la dynamique du peptidoglycane.....	54
2.1.2	<i>Caractérisation des acides téichoïques</i> .....	58
2.1.2.1	Préparation des échantillons.....	58
2.1.2.2	Caractérisation par la RMN du carbone.....	59
2.1.2.3	Caractérisation par la RMN du phosphore.....	62
2.2	Mise en évidence des interactions entre les cations métalliques, les acides téichoïques et le peptidoglycane .....	65
2.2.1	<i>Préparation des échantillons</i> .....	65
2.2.2	<i>Interactions avec le magnésium</i> .....	66
2.2.3	<i>Interactions avec le manganèse</i> .....	68
2.3	Conclusion .....	72

### **3. Etude des interactions entre les acides téichoïques de *Streptococcus pneumoniae* et la phosphorylcholine estérase CBPE..... 77**

3.1	La phosphorylcholine estérase CBPE .....	78
3.1.1	<i>Domaine catalytique et hydrolyse de la phosphorylcholine</i> .....	79
3.1.2	<i>Domaine liant la choline et interactions avec les acides téichoïques</i> .....	80
3.1.3	<i>Implications de CBPE dans la virulence de <i>S. pneumoniae</i></i> .....	81
3.2	Etude par RMN en phase solide des interactions entre la paroi cellulaire de <i>S. pneumoniae</i> et CBPE.....	83
3.2.1	<i>Un projet très ambitieux</i> .....	83
3.2.2	<i>Simulations</i> .....	85
3.2.2.1	Système de spins utilisé et conditions de simulation.....	85
3.2.2.2	Simulations de transferts PAIN-CP .....	86
3.2.2.3	Simulations de transferts DCP .....	88
3.2.3	<i>Préparation des échantillons</i> .....	90
3.2.4	<i>Résultats expérimentaux</i> .....	90
3.2.5	<i>Conclusion</i> .....	94

<h2><b>Partie II : RMN en phase solide et sensibilité</b></h2>
--

### **4. Méthodes rapides d'acquisition de spectres par RMN.....101**

4.1	La RMN multidimensionnelle.....	102
4.1.1	<i>Principes de la RMN multidimensionnelle</i> .....	102

4.1.2	<i>RMN multidimensionnelle et temps d'acquisition</i> .....	103
4.1.3	<i>RMN multidimensionnelle et résolution</i> .....	104
4.1.4	<i>Sensibilité et RMN</i> .....	105
4.1.5	<i>Pertinence de la RMN multidimensionnelle rapide en chimie et biologie</i> .	107
4.2	Accélération de l'acquisition d'un spectre multidimensionnel : réduction du nombre de scans via un échantillonnage différent .....	108
4.2.1	<i>Echantillonnage aléatoire</i> .....	108
4.2.2	<i>Le repliement de spectres</i> .....	108
4.2.3	<i>Dimensionnalité réduite ou RMN par projection</i> .....	109
4.2.4	<i>RMN par filtrage Hadamard</i> .....	111
4.2.5	<i>Spectroscopie « ultrafast single-scan »</i> .....	113
4.3	Accélération de l'acquisition d'un spectre multidimensionnel : réduction du temps entre chaque scan .....	116
4.3.1	<i>RMN en phase liquide</i> .....	116
4.3.1.1	Excitation via l'angle de Ernst .....	116
4.3.1.2	Manipulation sélective d'un type de spins .....	116
4.3.2	<i>RMN en phase solide</i> .....	117
4.3.2.1	Séquences utilisant des blocs à champs rf basse-puissance.....	118
4.3.2.2	Utilisation d'ions paramagnétiques .....	119
4.3.2.3	Utilisation d'impulsions sélectives.....	120

## **5. Impact des impulsions sélectives sur le retour à l'équilibre de l'aimantation des carbones en RMN en phase solide .....125**

5.1	Cas d'une molécule modèle : l'histidine.....	125
5.1.1	<i>Préparation et attribution de l'histidine</i> .....	125
5.1.2	<i>Mesure des constantes de temps de relaxation non-sélectives à basse vitesse de rotation à l'angle magique</i> .....	129
5.1.3	<i>Mesure des constantes de temps de relaxation sélectives à basse vitesse de rotation à l'angle magique</i> .....	132
5.1.4	<i>Mesure du signal sur bruit par unité de temps à basse vitesse de rotation à l'angle magique</i> .....	134
5.1.5	<i>Mesure des constantes de temps de relaxation à haute vitesse de rotation à l'angle magique</i> .....	137
5.1.6	<i>Mesure du signal sur bruit par unité de temps à haute vitesse de rotation à l'angle magique</i> .....	139
5.2	Cas d'échantillons de protéines hydratées .....	141
5.2.1	<i>Préparation des échantillons</i> .....	141

5.2.2	Mesure des constantes de temps de relaxation et comportement de l'aimantation après manipulation sélective.....	142
5.2.3	Mesure du signal sur bruit par unité de temps.....	144
5.2.4	Excitations directes sélectives et CPMAS-RELOAD .....	149
5.2.5	Vers le régime « Ultrafast ».....	154
5.3	Conclusion.....	159

## Partie III : RMN en phase solide et détermination structurale

### 6. Recouplage en RMN en phase solide.....167

6.1	Mesure de distances internucléaires par RMN en phase solide.....	168
6.1.1	Les différentes classes de distances .....	168
6.1.2	La troncature dipolaire.....	170
6.2	Techniques de recouplage homonucléaire .....	171
6.2.1	Techniques basées sur le phénomène de « Rotational Resonance » .....	171
6.2.2	La séquence PDSD.....	173
6.2.3	La séquence DARR/RAD .....	173
6.2.4	La séquence DONER.....	174
6.2.5	La séquence PARIS .....	174
6.2.6	La séquence MIRROR.....	175
6.2.7	La séquence PAR.....	175
6.2.8	La séquence RESORT.....	176
6.2.9	Les séquences CHHC/NHHN .....	177
6.3	Techniques de recouplage hétéronucléaire .....	177
6.3.1	La séquence de double polarisation croisée et ses variantes.....	178
6.3.2	La séquence REDOR et ses variantes.....	178
6.3.3	La séquence NHHC.....	180
6.3.4	La séquence PAIN-CP.....	180
6.4	Conclusion.....	180

### 7. Amélioration du mécanisme de recouplage TSAR en RMN en phase solide .....185

7.1	Théorie.....	185
7.1.1	Principes du mécanisme de recouplage TSAR.....	186
7.1.2	Effet d'un changement de phase de 180 degrés sur le mécanisme TSAR..	191
7.1.2.1	Changement de phase sur les trois canaux d'irradiation A, B et proton	192

7.1.2.2	Changement de phase sur les canaux d'irradiation A et B .....	193
7.1.2.3	Changement de phase sur le canal d'irradiation proton.....	193
7.2	Simulations numériques.....	194
7.2.1	<i>Cas homonucléaire</i> .....	196
7.2.2	<i>Cas hétéronucléaire</i> .....	203
7.3	Applications à la RMN biomoléculaire .....	206
7.3.1	<i>Une calibration simple en trois étapes seulement</i> .....	206
7.3.2	<i>Cas homonucléaire</i> .....	212
7.3.2.1	Profils expérimentaux.....	212
7.3.2.2	Expériences de corrélation carbone-carbone.....	213
7.3.3	<i>Cas hétéronucléaire</i> .....	216
7.4	Conclusion.....	217

<h2 style="text-align: center;">Partie IV : RMN en phase solide et archéologie</h2>
---

## 8. Etude de bois archéologiques par RMN en phase solide.....223

8.1	La paroi cellulaire végétale.....	223
8.2	Composition chimique et propriétés structurales du bois .....	224
8.3	Bois et archéologie : potentialité de la RMN haute résolution .....	226
8.3.1	<i>Difficultés liées à la conservation de bois archéologiques</i> .....	226
8.3.2	<i>La RMN comme outil de caractérisation du bois archéologique</i> .....	228
8.4	Edition spectrale en archéologie .....	229
8.4.1	<i>Séquences utilisant les couplages dipolaires</i> .....	231
8.4.2	<i>Séquences utilisant les couplages scalaires</i> .....	234
8.5	Attribution des spectres de bois archéologique obtenus par RMN en phase solide de résonance du carbone .....	236
8.6	Conclusion.....	237

## Annexes .....239

## Publications .....255

## Références bibliographiques .....259





## Abréviations et sigles utilisés

---

A <sub>2</sub> pm	Acide diaminopimélique
ACP	Amplification en Chaîne par Polymérase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Atomic Force Microscopy
AHT	Average Hamiltonian Theory
Ala	Alanine
ALT	Acides LipoTéichoïques
APHH-CP	Adiabatic-Passage Hartmann-Hahn Cross Polarization
APT	Attached Proton Test
ARN	Acide RiboNucléique
AT	Acides Téichoïques
BASE-TEDOR	BAnd-SElective-TEDOR
BEST	Band-selective Excitation Short-Transient
CAMP	Cationic AntiMicrobial Peptide
CBD	Choline Binding Domain
CBP	Choline Binding Protein
CBPE	Choline Binding Protein E
COSY	COrrrelation SpectroscopY
CP	Cross Polarization
CPMAS	Cross Polarization Magic Angle Spinning
CPNQS	Cross Polarization with Non-Quaternary Suppression
CPPI	Cross Polarization combined with Polarization Inversion
CPPI-DEP	Cross Polarization combined with Polarization Inversion and DEPolarization
CQ-PRODI	Chemical-shift Quadrupolar Projection-Reconstruction of One DImen- sional spectra
CSA	Chemical Shift Anisotropy
CW	Continuous-Wave
DARR	Dipolar Assisted Rotational Resonance
DCP	Double Cross Polarization
Ddl	Ligase D-alanine-D-Alanine
DFT	Density Functional Theory
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
DONER	DOuble Nucleus Enhanced Recoupling
DQ	Double-Quanta
DQF-COSY	Double-Quantum Filtered COSY
EDTA	acide Ethylène Diamine TétraAcétique
EPI	Echo Planar Imaging

FID	Free Induction Decay
FSLG	Frequency Switched Lee-Goldburg
FSR	Frequency Selective REDOR
FT	Fourier Transform
GFT NMR	G-matrix Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance
GlcNAc	N-acétylglucosamine
Glu	Acide glutamique
HH	Hartmann-Hahn
HMPA	HexaMéthylPhosphorAmide
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HORROR	HOmonucleaR ROtary Resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
iDCP	improved Double Cross Polarization
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double QUAtum Transfer Experiment
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
J-MQF	J-Multiple Quantum Filter
Lac	Acide lactique
LCPD	Long Cross Polarization and Depolarization
MIRROR	MIxed Rotational and ROtary Resonance
MLF	N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine-O-Méthyl
MOD-CP	amplitude-MODulated second-order Cross-Polarization
MurNAc	Acide N-acétylmuramique
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOP	Nuclear Overhauser Polarization
PACC	Paramagnetic relaxation-Assisted Condensed data Collection
PAIN-CP	Proton Assisted Insensitive Nuclei-Cross Polarization
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PAR	Proton Assisted Recoupling
PARIS	Phase-Alternated Recoupling Irradiation Scheme
PBP	Penicillin-Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PDS	Proton Driven Spin Diffusion
PEG	PolyEthylène Glycol
PG	peptidoglycane
ppm	partie par millions
PRE	Paramagnetic Relaxation Enhancement
PSRE	Proton Spin Relaxation spectral Edition
R <sup>2</sup>	Rotational Resonance
R <sup>3</sup>	Rotary Resonance Recoupling

R <sup>2</sup> W	Rotational Resonance Width
RAD	Rf Assisted Diffusion
REDOR	Rotational-Echo DOuble-Resonance
RELOAD	Relaxation Enhancement by a LOwer temperature of ADjacent spins
REPT	REcoupled Polarization Transfer
RESORT	REsonant Second-ORder Transfer
rf	radio fréquence
RFDR	Radio Frequency-Driven Recoupling
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SCPMAS	Short Cross Polarization Magic Angle Spinning
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLF	Separated-Local-Field
SLF-PRODI	SLF Projection Reconstruction of One-DImensional spectra
SOCp	Second-Order Cross Polarization
SOFAST	band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient
SPECIFIC-CP	SPECtrally Induced Filtering In Combination with Cross Polarization
SPI-CP	Simultaneous Phase Inversion Cross Polarization
SPINAL	Small Phase INcremental ALternation
TEDOR	Transferred-Echo DOuble Resonance
TPPI	Time-Proportional Phase Incrementation
TPPM	Two-Pulse Phase Modulated decoupling
TROSY	Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY
TSAR	Third Spin Assisted Recoupling
UC2QF COSY	Uniform-sign Cross-peak double-Quantum-Filtered COSY
XiX	X-inverse-X decoupling
ZF-TEDOR	Z-Filtered-TEDOR
ZQ	Zéro-Quanta



## Introduction générale



La RMN ou « Résonance Magnétique Nucléaire » s'appuie sur une propriété du noyau appelée le spin. Le fait d'avoir un spin non nul confère à ces particules des propriétés magnétiques, qui peuvent être comparées très grossièrement à de petits aimants. Une fois ces particules placées dans un champ magnétique, ce champ peut interagir avec leur spin, tout comme le champ magnétique terrestre fait tourner l'aiguille d'une boussole.

Une description plus scientifique du phénomène de RMN peut être donnée ainsi : un noyau de spin  $I$  soumis à un champ magnétique statique possède un moment magnétique qui ne peut prendre que  $2I+1$  orientations, possédant des niveaux d'énergie différents. Lorsqu'une irradiation radiofréquence est en plus appliquée au noyau étudié et que l'énergie des photons, qui constituent cette irradiation, correspond à l'énergie de transition d'un niveau d'énergie à l'autre, ces photons peuvent être absorbés par le noyau : il y a alors « résonance ». La réponse du système à cette excitation entraîne l'émission d'une onde électromagnétique caractéristique du noyau étudié qui peut être détectée.

Le phénomène de RMN fut observé pour la première fois à la fin de l'année 1945 par deux équipes américaines différentes : Purcell, Torrey et Pound à l'université de Harvard <sup>1</sup> et Bloch, Hansen et Packard à Stanford <sup>2</sup> sur des échantillons de matière condensée <sup>a</sup>. L'échantillon de paraffine étudié par Purcell et ses collaborateurs ne pesait pas moins d'un kilogramme ! Cette découverte valut à Purcell et Bloch le prix Nobel de physique en 1952.

La RMN, à ses débuts, fut très largement étudiée par des physiciens, qui effectuèrent alors un énorme travail de compréhension de cette technique (théorie de la relaxation dans les liquides et solides <sup>3-5</sup>, découverte de l'effet Overhauser dans les métaux <sup>6</sup>, de la diffusion de spins dans les solides <sup>7</sup>, de l'effet des ions paramagnétiques <sup>7, 8</sup>, etc.). Deux découvertes fondamentales firent basculer la RMN dans la physico-chimie. La découverte du déplacement chimique eut lieu simultanément par Knight <sup>9</sup>, Proctor et Yu <sup>10</sup> et Dickinson <sup>11</sup> entre 1949 et 1950. Il pourrait paraître évident que tous les noyaux d'un même type au sein d'une molécule (par exemple tous les protons d'un même acide aminé) possèdent tous la même fréquence de résonance. Cependant, l'environnement électronique dans lequel se trouve chaque noyau va légèrement modifier la valeur du champ magnétique expérimenté par chacun d'eux. Cette propriété, le déplacement chimique, dépend par exemple des groupes fonctionnels (amide, acide, cétone etc.) auxquels appartient le noyau observé. Les différents protons d'un même acide aminé sont alors discernables sur un spectre RMN. La deuxième découverte qui permit à la RMN de devenir une

---

<sup>a</sup> Matière, quelle que soit sa phase, où le nombre de constituants est grand et où les interactions entre eux sont fortes.



technique de choix en chimie est celle des couplages scalaires ou couplages spin-spin par Gutowsky et McCall <sup>12</sup>, et Hahn et Maxwell <sup>13</sup>, encore une fois simultanément, en 1951. Les couplages spin-spin sont définis comme les interactions entre deux spins ou noyaux voisins dans la séquence des atomes de la molécule étudiée.

Lors des deux premières décennies de la RMN, la fréquence de l'onde électromagnétique était maintenue constante alors que la valeur du champ magnétique statique était balayée (par modification de la valeur du courant au sein de l'électroaimant générant le champ magnétique). Dans ce cas, seule une partie des noyaux, dont les moments magnétiques possèdent une différence de niveaux d'énergie proportionnels au champ magnétique principal testé, contribuait au signal RMN. Cette méthode est appelée « RMN à ondes continues ». L'introduction de la « RMN impulsionnelle » en 1966 par Ernst et Anderson fut une véritable révolution : l'utilisation d'impulsions rf courtes tout en gardant le champ principal constant permet d'exciter tous les spins du spectre RMN en même temps, pour un même type de noyau <sup>14</sup>. Le signal enregistré comprend alors la contribution simultanée de tous les spins. Ce signal, fonction du temps, peut être transformé en un spectre, exprimé en fréquences, par une opération mathématique appelée transformation de Fourier. Le gain de temps lors des expériences RMN fut considérable.

Dix ans plus tard, en 1976, Richard Ernst fit faire à nouveau un grand pas à la RMN en introduisant la RMN multidimensionnelle <sup>15</sup>. Cette technique permet de répartir le signal RMN selon plusieurs dimensions et de mettre en lumière les interactions entre les spins. Richard Ernst obtint le prix Nobel de Chimie en 1991 pour ses travaux sur la RMN impulsionnelle et multidimensionnelle.

Grâce à ces avancées, il devint alors beaucoup plus aisé d'étudier en solution des molécules possédant un intérêt biologique telles que les protéines. Le nombre croissant de nouvelles « séquences d'impulsions » multidimensionnelles mettant en contact les spins ainsi que l'augmentation de leur complexité menèrent à la première détermination de structure tridimensionnelle de protéine en 1983 (le glucagon, 3,5 kDa <sup>b</sup>) <sup>16</sup>. A la fin des années 1980, le marquage isotopique fut appliqué aux protéines <sup>c</sup>. Ceci rendit l'enregistrement de spectres multidimensionnels (2D, 3D voire même 4D) de protéines beaucoup plus rapide <sup>17-19</sup>. La RMN comme technique de détermination structurale de protéi-

---

<sup>b</sup> Dalton (Da) : unité de masse égale à 1/12 de la masse d'un atome de carbone 12.

<sup>c</sup> Le marquage isotopique consiste à remplacer les noyaux non détectables par RMN par leur isotope détectable. Par exemple, le carbone 13 et l'azote 15, détectables, ont une abondance naturelle de seulement 1,1 % et 0,37 % respectivement. Le but du marquage est d'augmenter cette proportion.

nes était lancée. Kurt Wüthrich fut très actif dans ce domaine. Il obtint d'ailleurs le prix Nobel de chimie pour « le développement de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire servant à établir la structure tridimensionnelle de macromolécules en solution » en 2002.

L'intérêt des biologistes et chimistes pour la RMN en phase solide prit beaucoup plus de temps à se développer. En effet, s'il est courant d'obtenir des spectres très bien résolus en RMN en phase liquide, ceci est loin d'être le cas en phase solide. Voyons pourquoi. L'obtention de spectres possédant une bonne résolution <sup>d</sup> en RMN en phase liquide est possible grâce au mouvement brownien des molécules. Ce mouvement moyenne à zéro les interactions anisotropes (dépendantes de l'orientation de la molécule dans son milieu). Seules persistent les interactions isotropes, telles que les couplages spin-spin et le déplacement chimique. Les raies obtenues sur un spectre de RMN en phase liquide sont donc plutôt fines. Cependant, dans le cas des échantillons préparés sous forme solide, il n'y a pas ou peu de mouvement. Les interactions anisotropes (telles que les interactions dipolaires, à travers l'espace) ne sont donc pas moyennées et dominent le spectre de RMN en phase solide, qui possède alors des raies très larges. Par conséquent, il fallut tout d'abord mettre au point des techniques permettant de réduire la largeur des raies. Pour ce faire, en 1958, Andrew et Lowe proposèrent de faire tourner l'échantillon autour d'un axe incliné par rapport au champ magnétique principal d'un angle correspondant à la diagonale d'un cube, appelé « angle magique » <sup>20, 21</sup>. Les interactions anisotropes sont alors moyennées (mais pas nécessairement à zéro) et les raies un peu moins larges.

Un autre problème présent en RMN est son manque de sensibilité. Cependant, cet inconvénient n'est pas aussi marqué pour tous les noyaux. Par exemple, les protons possèdent une assez bonne sensibilité de détection, ce qui n'est pas le cas des hétéronoyaux tels que les carbones et les azotes. Afin d'observer ces noyaux avec une meilleure sensibilité, différentes techniques de transfert d'aimantation du proton vers les hétéronoyaux ont été développées, comme les méthodes INEPT (« Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer ») et CPDAS (« Cross Polarization Magic Angle Spinning ») en RMN des solutions et RMN en phase solide, respectivement <sup>22, 23</sup>. Afin de gagner en sensibilité, l'idée la plus évidente semble être néanmoins la détection des protons. Ceci est tout à fait réalisable (et utilisé) en RMN des solutions mais n'est pas applicable aussi facilement en RMN en phase solide. En effet, les protons sont impliqués dans des interactions dipolaires homonucléaires très fortes. Les spectres en détection proton en phase solide sont très souvent es-

---

<sup>d</sup> Dont les résonances des différents noyaux sont discernables, même chez de grosses molécules.

sentiellement dominés par ces couplages, la rotation à l'angle magique ne les moyennant pas suffisamment.

Dans ces conditions, nous pouvons parfaitement comprendre pourquoi, à ses débuts, la RMN en phase solide ne semblait pas du tout adaptée à l'étude structurale de systèmes biologiques tels que les protéines. Cette technique fut plutôt utilisée comme méthode de caractérisation de la composition chimique, de la conformation locale et de la dynamique de polymères tels que les composés ligno-cellulosiques.

En parallèle aux développements méthodologiques, l'abandon des électroaimants pour des aimants supraconducteurs permet de faire avancer la RMN. L'augmentation des champs magnétiques depuis les débuts de la RMN est impressionnante : le spectromètre le plus puissant au monde actuellement en fonctionnement possède un champ magnétique de 23,5 Tesla, soit près de 500 000 fois le champ magnétique terrestre ! Dans le cas particulier de la RMN en phase solide, ces hauts champs magnétiques combinés au développement de sondes permettant de faire tourner l'échantillon à des vitesses de plus en plus élevées ont permis un énorme gain en résolution, en moyennant de mieux en mieux les couplages dipolaires <sup>24, 25</sup>, ainsi qu'en sensibilité.

Enfin, l'étude de protéines par RMN en phase solide n'aurait pas été possible sans un net progrès dans la préparation des échantillons. Les premières protéines étudiées étaient lyophilisées (ou déshydratées par sublimation), ce qui permettait d'obtenir une poudre. Dans ce cas, une légère variation de la structure locale de la protéine, ou conformation, donne lieu à un élargissement des raies. Au début des années 2000, il fut proposé d'utiliser des échantillons de protéines microcristallines <sup>26</sup>. Cette cristallisation, en « sélectionnant » une conformation locale de la protéine, permet de réduire considérablement la largeur de raies des échantillons. Enfin, il est maintenant possible de rencontrer dans la littérature des échantillons de protéines précipitées, qui contiennent encore suffisamment de solvant pour permettre une certaine liberté de mouvement à la molécule. Celle-ci permet de moyennner l'effet des différentes conformations locales sur les largeurs de raie.

Toutes ces améliorations, combinées au développement de séquences d'impulsions spécifiques à la RMN en phase solide conduisirent à la première détermination structurale tridimensionnelle de protéine par cette technique en 2002 (SH3, 7 kDa) <sup>27</sup>.

Où en est-on actuellement en RMN biomoléculaire ? La RMN des solutions est très utilisée pour l'étude de molécules d'intérêt biologique comme en témoignent les 8500 structures de protéines recensées dans la « Protein Data Bank ». Cette technique a vu néanmoins apparaître une limitation liée à la taille du système étudié. Plus la molécule possède une taille importante, plus son mouvement brownien est ralenti, ce qui pose des problèmes de relaxation.

Les spectres enregistrés sur de tels échantillons voient donc leur largeur de raie augmenter !

Depuis le début des années 2000, la RMN en phase solide est devenue une alternative intéressante à la RMN des solutions. La RMN en phase solide possède l'avantage certain qu'elle n'est pas limitée en théorie par la taille des molécules. De plus, elle permet l'étude de systèmes non abordables par la RMN en phase liquide ou par d'autres techniques de caractérisation telles que la cristallographie de rayons X. C'est ainsi qu'il a été possible d'aboutir à la structure tridimensionnelle de protéines formant des fibrilles <sup>28</sup>, impliquées dans les maladies neurogénératives telles Alzheimer et Parkinson, et à la structure de protéines membranaires <sup>29</sup>. Trente et une structures (tout type de protéines confondues) sont actuellement disponibles dans la PDB.

Les limitations de la RMN en phase solide à son application en biologie, biochimie ou chimie sont cependant encore nombreuses. Tout d'abord, un problème de sensibilité : le temps consacré à une expérience reste très important, notamment à cause des temps de relaxation (ou temps de retour à l'équilibre) très longs rencontrés dans les échantillons. Il en découle que la sensibilité des expériences par unité de temps reste très insuffisante.

Ensuite, malgré l'amélioration apportée par la rotation à l'angle magique, les vitesses de rotation de plus en plus importantes et le développement de hauts champs magnétiques, la résolution de spectres de biomolécules reste encore bien médiocre. Ceci pose un problème lors de l'étude de gros systèmes. La plus grosse protéine étudiée à ce jour en RMN en phase solide possède une masse de seulement 17,6 kDa alors que les protéines étudiées en solution atteignent 900 kDa <sup>30, 31</sup> !

Enfin, de nombreux progrès sont encore à prévoir dans le développement méthodologique. Notamment, il est nécessaire de mettre au point des séquences dites de « recouplage » qui permettent de réintroduire les interactions dipolaires moyennées par la rotation à l'angle magique. En effet, de la force de ces interactions entre les spins peuvent être tirées des informations portant sur la distance ou les angles entre les noyaux. La somme des « contraintes structurales » recueillies sur un échantillon peut mener au calcul de la structure tridimensionnelle du système étudié. A ce jour, de telles séquences existent déjà, mais les contraintes « à longue distance » entre les spins, les plus importantes d'un point de vue structurale, sont encore trop difficilement détectées et en trop petit nombre.

Cette thèse s'inscrit dans les préoccupations actuelles de la RMN en phase solide appliquée aux biomolécules. La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude d'un système biologique complexe : la paroi cellulaire bactérienne. Ce système, dont le poids moléculaire dépasse plusieurs Giga daltons, est très certainement l'un des plus gros systèmes biologiques étudié par

RMN. Cette paroi bactérienne, constituée notamment de peptidoglycane, est au cœur des recherches actuelles tendant à la découverte de nouvelles antibiothérapies, plus que nécessaires au vu de la résistance bactérienne grandissante aux antibiotiques. Elle est aussi très étudiée dans le but de synthétiser un vaccin contre des pathologies telle que la pneumonie car elle est le lieu d’ancrage de protéines permettant l’adhésion de la cellule bactérienne à la cellule hôte. Cependant, l’état d’avancement de ces recherches nécessite d’obtenir davantage d’informations sur ce système. Nous verrons que notre étude par RMN en phase solide de la paroi cellulaire bactérienne, sur des échantillons extraits de cellules bactériennes mais aussi sur des échantillons de bactéries vivantes, nous permet d’obtenir des renseignements sur la structure mais aussi sur la dynamique de certains de ses constituants.

De plus, l’étude difficile des interactions entre une protéine et un composant de la paroi que nous avons menée illustre parfaitement le besoin de développement méthodologique rencontré en RMN en phase solide. En effet, le manque de sensibilité ainsi que l’inefficacité des séquences de recouplage existantes sont criantes dans cet exemple.

La deuxième partie de cette thèse est donc consacrée à l’investigation de phénomènes permettant soit de réduire le temps expérimental soit d’améliorer la sensibilité des expériences. Nous avons montré que la manipulation sélective de certains atomes de carbone permet le retour à l’équilibre plus rapide de leur aimantation dans un échantillon complètement marqué. Nous avons mis en évidence et étudié ce phénomène à la fois sur une molécule modèle et sur des échantillons de protéines et pour différentes vitesses de rotation à l’angle magique.

La troisième partie de ce chapitre décrit comment nous avons modifié les séquences de recouplage PAR<sup>32</sup> et PAIN-CP<sup>33, 34</sup> existantes afin d’améliorer leur efficacité de transfert d’aimantation entre les spins. Nous montrons que, sous certaines conditions, un changement de phase des irradiations constituant le bloc de recouplage améliore les performances des séquences PAR et PAIN-CP par un facteur deux et élargit d’autant les conditions de recouplage. La mise en place des séquences PAR et PAIN-CP en est fortement facilitée. L’amélioration des performances des séquences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift est démontrée sur un échantillon de protéine de 20 kDa et pour différentes conditions de vitesse de rotation et de champs magnétiques statiques.

Enfin, la quatrième partie de cette thèse porte sur des échantillons biologiques étudiés depuis très longtemps en RMN en phase solide : les composés ligno-cellulosiques. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux bois archéologiques. Une spécificité évidente de ces échantillons est qu’il est impossible de les marquer isotopiquement, au contraire de tous les échantillons que nous présentons dans les trois premières parties. Comme les techniques

multidimensionnelles sont difficilement à la portée de tels échantillons, des techniques facilitant leur attribution ont tout de même été mises au point, comme les méthodes d'édition spectrale. Cette quatrième partie passe en revue ces techniques et compare leur efficacité et leur facilité d'utilisation sur des échantillons de bois archéologiques non enrichis. Le but de cette étude est de faciliter le choix d'une méthode d'édition spectrale à un utilisateur de RMN en routine.



**Partie I**  
**Etude de la paroi cellulaire bactérienne par**  
**RMN en phase solide**





## Chapitre 1

---

### La paroi cellulaire bactérienne

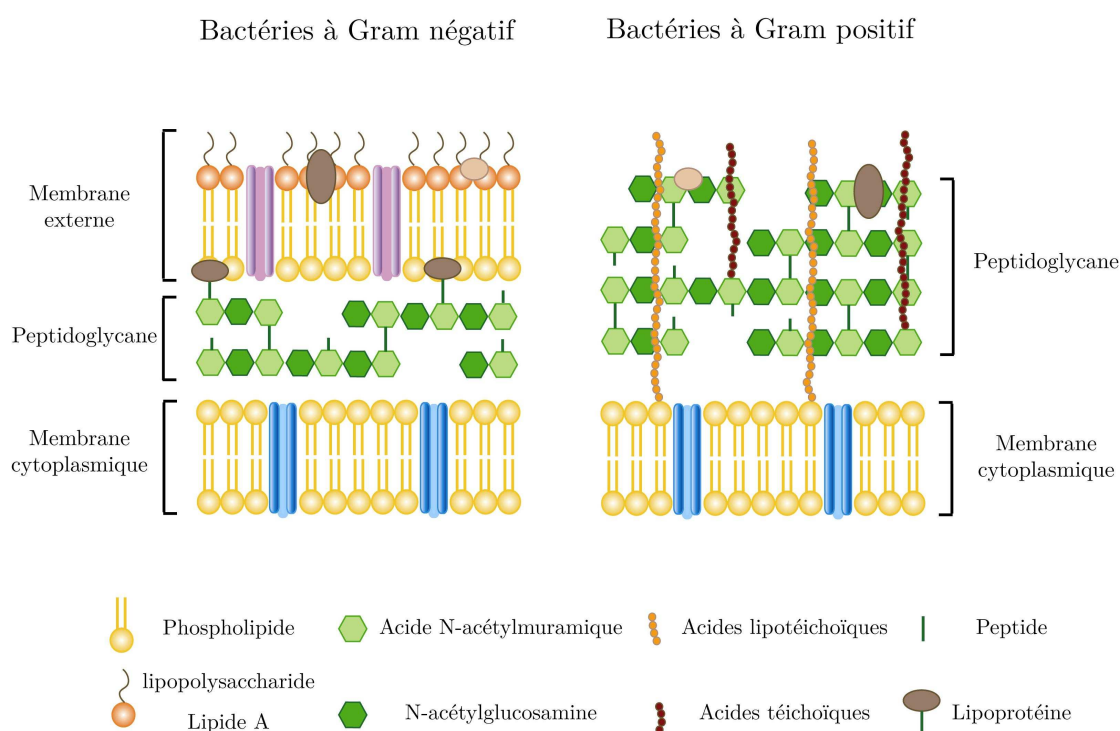


# 1. La paroi cellulaire bactérienne

La paroi cellulaire, située à l'interface entre la bactérie et son environnement, est un élément essentiel à son bon fonctionnement et à sa survie. L'un des constituants principaux de la paroi cellulaire est le peptidoglycane, qui à la fois donne sa forme à la cellule <sup>35</sup>, empêche sa lyse sous l'influence de la pression osmotique dans le cytoplasme (5 à 25 atmosphères) <sup>36</sup> et intervient dans la division cellulaire. Le peptidoglycane sert également de plateforme à la cellule bactérienne sur laquelle se fixent de nombreux éléments tels que les acides téichoïques (impliqués dans l'infection des cellules hôtes et dans l'interaction avec les métaux) <sup>37, 38</sup>, les protéines nécessaires à sa morphogénèse et à sa modification au court du temps (les transpeptidases et les glycosyltransférases par exemple) <sup>39</sup>, et les protéines impliquées dans la reconnaissance des cellules hôtes (comme les CBP) <sup>40, 41</sup>. Le peptidoglycane est également reconnu par le système immunitaire de l'organisme sujet à une infection bactérienne <sup>42</sup>. L'importance du peptidoglycane est telle que la dégradation ou l'inhibition de sa biosynthèse entraîne la mort de la cellule. Les antibiotiques tirent profit de ce point faible. Par exemple, la pénicilline et ses dérivés (antibiotiques  $\beta$ -lactame) inhibent la synthèse du peptidoglycane en se liant de façon covalente aux enzymes D-D-transpeptidases. Cependant, de nombreuses bactéries ont su développer des moyens de résistance aux antibiotiques. Cette résistance est très préoccupante, entre autres raisons parce qu'elle s'est développée très rapidement. La découverte de nouvelles antibiothérapies est donc devenue urgente. Au vu de l'importance de la paroi cellulaire pour la bactérie, une meilleure compréhension de sa biosynthèse et de son fonctionnement ainsi que des mécanismes de résistance de ces organismes est indispensable.

Les bactéries peuvent être classées en deux catégories selon les caractéristiques de leur paroi cellulaire. Les bactéries dites à « Gram négatif » ont une enveloppe constituée d'une membrane externe, d'un espace périplasmique contenant la paroi cellulaire (et donc le peptidoglycane) et d'une membrane cytoplasmique. Parmi les bactéries à Gram négatif, nous pouvons recenser la très connue *Escherichia coli*, mais aussi les bactéries des genres *Salmonella*, *Legionella*, *Hemophilus*, *Enterobacter* etc., parmi lesquelles de nombreuses espèces sont pathogènes. La structure de l'enveloppe des bactéries à Gram positif est un peu différente puisqu'elle ne contient pas de membrane externe. De plus, la couche de peptidoglycane au sein de l'espace périplasmique est beaucoup plus épaisse <sup>43</sup>. Enfin, les bactéries à Gram positif possèdent un constituant supplémentaire : les acides téichoïques. Les bactéries à Gram positif comprennent entre autre les genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Strep-*

*tococcus* et *Enterococcus* parmi lesquels certaines espèces sont également pathogènes. Une représentation schématique de l'enveloppe de ces deux catégories de bactéries est donnée en Figure 1-1. Cette classification se base sur le test de Gram, mis en place en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram. Lors de ce test, le cytoplasme des bactéries est tout d'abord teint. Le colorant est ensuite lavé à l'alcool. Les bactéries dites à « Gram positif » conserveront leur coloration due à leur couche plus épaisse de peptidoglycane empêchant un lavage correct.



**Figure 1-1. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries dites à Gram négatif et à Gram positif.**

Le travail reporté dans ce manuscrit portant essentiellement sur la caractérisation chimique et l'étude des interactions avec les métaux du peptidoglycane et des acides téichoïques, nous consacrerons ce chapitre à une présentation de la composition chimique de ces systèmes ainsi qu'à la description de leurs rôles respectifs.

## 1.1 Le peptidoglycane

Le peptidoglycane, ou muréine, est situé dans le périplasme des bactéries et forme une macromolécule de plusieurs giga Daltons enveloppant la cellule bactérienne. Sa composition chimique est bien connue. La muréine est

composée d'un polymère de glycanes auquel sont attachés des peptides courts (entre 3 et 5 acides aminés) dont la composition chimique varie en fonction de l'espèce bactérienne. Ce peptide peut former une liaison peptidique avec un autre peptide porté par une chaîne de glycanes avoisinante, l'ensemble formant un réseau tridimensionnel. L'insolubilité de cette molécule due à sa taille importante ainsi qu'à son caractère non cristallin a empêché pour l'instant une détermination précise de sa structure tridimensionnelle, même si plusieurs modèles ont été proposés.

### 1.1.1 Composition chimique du peptidoglycane

#### 1.1.1.1 La chaîne de glycanes

La chaîne de glycanes est constituée de la répétition d'un dimère, formé par la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'acide N-acétylmuramique (MurNAc) reliés entre eux par une liaison osidique  $\beta(1\rightarrow4)$  <sup>44</sup> (Cf. Figure 1-2). La formation des chaînes de glycanes par des réactions de transglycosylation a lieu à la surface externe de la membrane cytoplasmique. Dans le cas des bactéries à Gram négatif et pour quelques bactéries à Gram positif telles *B. subtilis*, la chaîne de glycanes se termine par l'acide 1,6-anhydro-N-acétylmuramique <sup>45</sup>, qui possède un cycle intramoléculaire du C<sub>1</sub> au C<sub>6</sub>. Les autres bactéries possèdent un groupement terminal réducteur, qui peut être GlcNAc ou MurNAc.

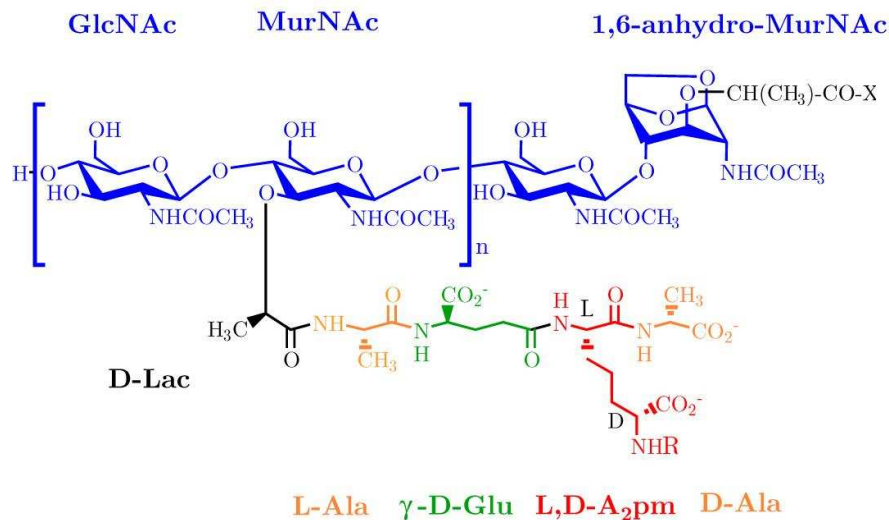
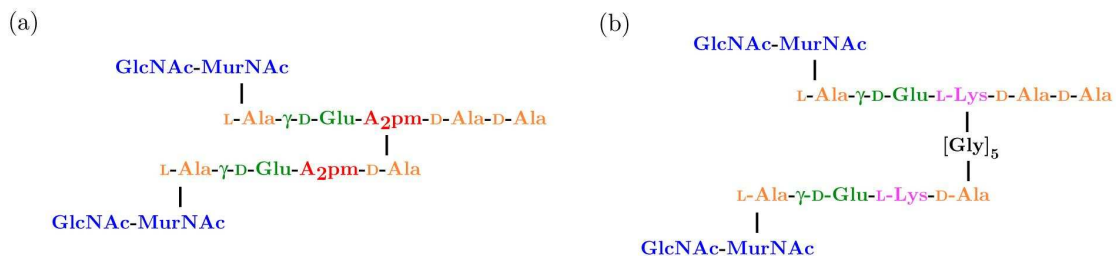


Figure 1-2. Structure du peptidoglycane de *E. coli*. R représente un peptide attaché à une chaîne de glycanes voisine. X représente un peptide attaché au groupement lactyl du 1,6-anhydro-MurNAc.

La longueur de la chaîne de glycanes varie en fonction de l'espèce et des conditions dans lesquelles grandissent les bactéries. Par exemple, la chaîne de glycanes de *E. coli* (Gram négatif) possède jusqu'à 30 dimères <sup>36, 45, 46</sup>. Les *Bacilli* quant à elles possèdent des chaînes de glycanes d'une longueur moyenne pouvant atteindre 5000 dimères <sup>47, 48</sup>, alors que les chaînes de glycanes de *S. aureus* sont bien plus courtes avec des valeurs moyennes de 6 dimères <sup>49</sup>. Il est intéressant de remarquer que la longueur des chaînes de glycanes n'est pas proportionnelle à l'épaisseur de la couche de peptidoglycane : en effet, les bactéries à Gram positif possèdent toutes une couche épaisse de peptidoglycane.

### 1.1.1.2 Les chaînes peptidiques

La composition chimique de la chaîne peptidique est très variable et dépend de l'espèce bactérienne (Cf. Figure 1-2, Figure 1-3 et Table 1-1) <sup>36, 39, 45, 48</sup>. Cette variation provient soit de la spécificité de la ligase ajoutant l'acide aminé soit de modifications apparaissant plus loin dans la synthèse. Dans ce dernier cas, les modifications dépendent beaucoup de l'environnement dans lequel grandissent les bactéries <sup>50</sup>. Les chaînes peptidiques sont attachées aux groupes L-lactate portés par les acides N-acétylmuramiques. Le premier acide aminé est ajouté par la ligase MurC. Dans la plupart des cas, ce premier monomère est la L-Alanine. L'ajout du second acide aminé est catalysé par la ligase MurD. Cette enzyme ajoute toujours l'acide D-glutamique, cependant des modifications peuvent survenir après l'ajout.



**Figure 1-3. Représentation schématique de la chaîne de peptides et des ponts interpeptidiques de (a) *E. coli*, de *B. subtilis* et de (b) *S. aureus*. Dans cet exemple, la réticulation est de type 3,4.**

La nature du troisième acide aminé est la plus variable. Son ajout est catalysé par la ligase MurE. Généralement, ce troisième monomère est un acide diaminé, comme l'acide diaminopimélique (A<sub>2</sub>pm) pour la plupart des bactéries à Gram négatif et la L-Lysine pour la majorité des bactéries à Gram

positif. De même, des modifications peuvent survenir après constitution de la chaîne peptidique.

Position	Résidu rencontré	Exemples
1	L-Ala	La plupart des espèces
	Gly	<i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brevibacterium imperiale</i>
	L-Ser	<i>Butyribacteriu rettgeri</i>
2	D-isoglutamate	La plupart des bactéries à Gram négatif
	D-isoglutamine	La plupart des bactéries à Gram positif, Mycobactéries
	<i>threo</i> -3-Hydroxyglutamate	<i>Microbacterium lacticum</i>
3	<i>méso</i> -A <sub>2</sub> pm	La plupart des bactéries à Gram négatif, Bacilli, Mycobactéries
	L-Lys	La plupart des bactéries à Gram positif
	L-Orn	Spirochetes, <i>Thermus thermophilus</i>
	L-Lys / L-Orn	<i>Bifidobacterium globosum</i>
	L-Lys / D-Lys	<i>Thermogota maritima</i>
	LL-A <sub>2</sub> pm	<i>Streptomyces albus</i> , <i>Propionibacterium peter-sonii</i>
	<i>méso</i> -lanthionine	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
	L-2,4-Diaminobutyrate	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	L-Homosérine	<i>Corynebacterium poinsettiae</i>
	L-Ala	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
	L-Glu	<i>Arthrobacter</i> J. 39
	<i>méso</i> -A <sub>2</sub> pm amidé	<i>Bacillus subtilis</i>
	2,6-Diamino-3-hydroxypimelate	<i>Ampuralliella regularis</i>
4	L-5-Hydroxylysine	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	N <sup>γ</sup> -acétyl-L-2,4-diaminobutyrate	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
5	D-Ala	Toutes les bactéries
5	D-Ala	La plupart des bactéries
	D-Ser	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	D-Lac	<i>Lactococcus casei</i> , Enterococci ayant acquis une résistance à la vancomycine

Table 1-1. Exemples de résidus rencontrés dans la chaîne peptidique, traduit de Vollmer *et al.* <sup>36</sup>.



Les quatrième et cinquième acides aminés sont ajoutés sous forme d'un dipeptide, qui est dans la plupart des cas le D-Alanine-D-Alanine. L'enzyme Ddl catalyse la formation de ce dipeptide avant que la ligase MurF ne l'incorpore. Les bactéries résistantes à l'antibiotique Vancomycine sont un cas particulier. Elles ont mis en place un moyen de résistance ingénieux : la D-Ala terminale est remplacée par un D-Lactate car l'affinité du depsipeptide D-Ala-L-Lac pour l'antibiotique est beaucoup plus faible <sup>51</sup>.

Les enzymes responsables des autres variations apparaissant après les étapes catalysées par les ligases, telles que l'amidation ou l'acétylation, sont encore pour la plupart inconnues. L'amidation du groupement carboxyle en position  $\alpha$  de l'acide glutamique (donnant la D-isoglutamine) et celle du groupement carboxyle en position  $\epsilon$  de l'acide *méso*-diaminopimélique sont très fréquentes. Enfin, les chaînes de peptides sont le lieu d'ancrage des protéines de l'enveloppe cellulaire <sup>52</sup> telle que la lipoprotéine de Braun dans le cas des bactéries à Gram négatif (dont *E. coli*) <sup>53</sup>.

### 1.1.1.3 Réticulation et ponts interpeptidiques

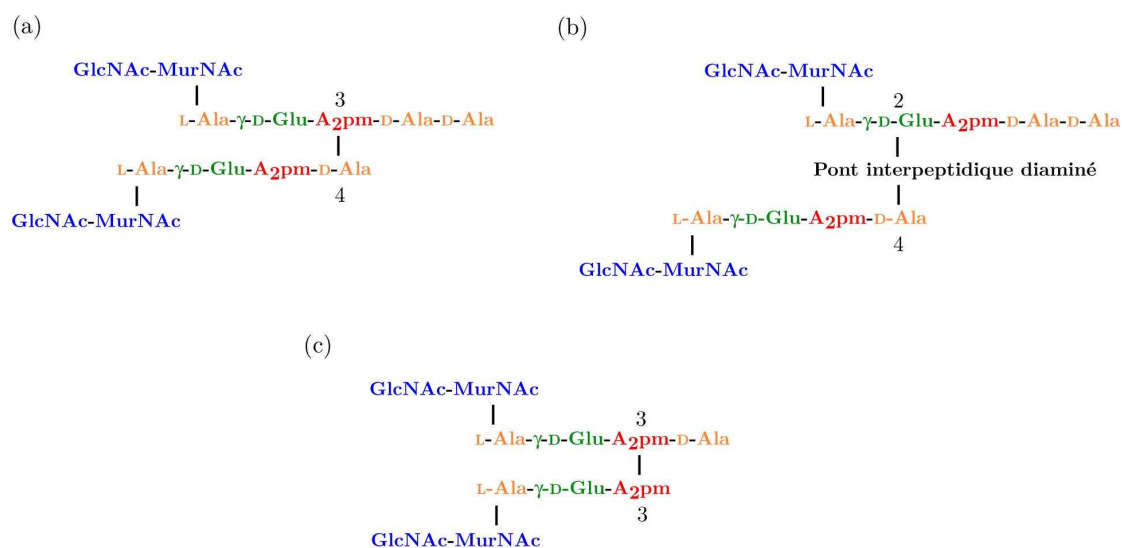
La réticulation entre deux chaînes peptidiques a lieu entre un groupe fonctionnel carboxyle d'un acide aminé d'une chaîne A (le donneur d'acyle) et un groupe fonctionnel amine d'un acide diaminé d'une chaîne B (l'accepteur d'acyle), soit directement, soit grâce à un pont peptidique court. La plupart des variations concernant la partie peptidique du peptidoglycane est relative au mode de réticulation entre chaînes peptidiques ou à la composition du pont interpeptidique. Les réactions de réticulation sont catalysées par le domaine transpeptidase des protéines liant la pénicilline (ou « Penicillin-Binding Proteins », PBPs), appelées ainsi à cause de leur affinité pour les antibiotiques  $\beta$ -lactame comme la pénicilline <sup>54</sup>.

Les différents modes de réticulation peuvent être classés en trois grandes catégories <sup>55</sup> (Cf. Figure 1-4). Dans la première, la réticulation, dite 3-4, implique le groupe amine de la chaîne latérale du résidu en position 3 et le groupe carboxyle du D-Ala en position 4 (Cf. Figure 1-3). Il s'ensuit l'élimination du D-Ala terminal. Cette réaction est catalysée par les enzymes D-D transpeptidases. Ce mode de réticulation est le plus commun et peut être direct (cas de la plupart des bactéries à Gram négatif) ou faire intervenir un pont peptidique court (comme dans la majorité des bactéries à Gram positif). La deuxième catégorie est rencontrée seulement parmi les bactéries corynéformes phytopathogènes. La réticulation, dite 2-4, a lieu entre le groupe carboxyle en position  $\alpha$  du D-Glu en position 2 et le groupe carboxyle du D-Ala en position 4. Afin que la première chaîne soit un accepteur d'acyle, un pont

interpeptidique diaminé est nécessaire. Enfin, l'acide aminé D-Ala en position 4 n'est pas le seul donneur d'acyle possible, le groupe carboxyle de l'acide aminé en position 3 peut aussi jouer ce rôle. Il en découle une réticulation de type 3-3, originellement découverte dans les Mycobactéries<sup>56</sup>. Chez les autres bactéries, ce type de réticulation est un mode de résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactame puisque la réaction d'amidation est catalysée par des enzymes L-D transpeptidases qui sont peu sensibles à ces antibiotiques<sup>57, 58</sup>.

La taille du pont interpeptidique peut varier entre un et sept acides aminés<sup>36</sup>. Les plus fréquemment rencontrés sont la Glycine, la L-Alanine, la L- ou D-Serine et l'acide L- ou D-glutamique. Par exemple, *S. aureus* possède un pont interpeptidique composé de cinq Glycines (Cf. Figure 1-3). Dans le cas des réticulations 2-4, la L- ou D-Lysine ou le D-2,4-diaminobutyrate sont très présents.

Les variations du degré de réticulation sont considérables. Il peut aller de 20 % dans le cas de *E. coli*<sup>45</sup> à 93 % dans le cas de *S. aureus*<sup>59, 60</sup> en passant par 40 % pour *B. subtilis*.



**Figure 1-4.** Différents modes de réticulation rencontrés chez les bactéries. (a) Réticulation de type 3-4, (b) réticulation de type 2-4 et (c) réticulation de type 3-3.

### 1.1.2 Propriétés biophysiques du peptidoglycane

De nombreuses études par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence la forme et la taille des sacculi. Ils possèdent une structure en forme de sac qui respecte les dimensions et la forme de la cellule bactérienne

dont ils sont issus. Par exemple, le sacculus de *E. coli* mesure de deux à quatre  $\mu\text{m}$  de long et de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre <sup>35, 61</sup>.

L'épaisseur du peptidoglycane a également été étudiée, ce par trois méthodes : la microscopie électronique, la microscopie à force atomique et la spectroscopie neutronique. Les résultats obtenus par microscopie électronique varient beaucoup en fonction de la technique utilisée, qui parfois peut créer des artefacts. Ces résultats sont donc à considérer avec circonspection <sup>62, 63</sup>. Cependant, en 2003, la microscopie électronique à cryotransmission a permis de visualiser les sacculi de bactéries à Gram négatif tout en produisant peu d'artefacts. Les auteurs ont pu observer que le peptidoglycane de *E. coli* a une épaisseur de 6,35 nm <sup>64</sup>. L'épaisseur du peptidoglycane a également été étudiée par diffusion de neutrons aux petits angles <sup>65</sup>. L'épaisseur du sacculus de *E. coli* ne dépassait pas 7 nm. Enfin, la microscopie à force atomique a révélé un peptidoglycane épais de 6 nm <sup>66</sup>. Ces deux dernières techniques ont un avantage majeur : elles permettent d'étudier des échantillons hydratés.

Le peptidoglycane est un polymère plutôt élastique, qui peut de façon réversible s'étirer ou rétrécir. Cette propriété est due principalement à l'élasticité des peptides <sup>67</sup>, alors que les chaînes de glycanes sont plutôt rigides <sup>68</sup>. La microscopie à force atomique a montré que les sacculi étaient deux à trois fois plus déformables selon le grand axe de la cellule bactérienne que selon son petit axe <sup>66</sup>. Cette anisotropie serait une conséquence du fait que les chaînes de glycanes seraient orientées perpendiculairement au grand axe de la cellule.

La taille des pores du peptidoglycane a été estimée à 4 nm de diamètre environ, ce qui théoriquement, permettrait la pénétration de protéines ayant une masse moléculaire au maximum de 24 kDa. En tenant compte de l'élasticité du peptidoglycane, des protéines ayant une masse jusqu'à 50 kDa pourraient également diffuser à travers la muréine <sup>69</sup>. Une autre étude a montré que des cellules de *E. coli* soumises à un choc hyperosmotique relarguaient des protéines ayant une masse moléculaire pouvant atteindre 100 kDa, ce qui correspond à des pores de 6 nm de diamètre <sup>70</sup>.

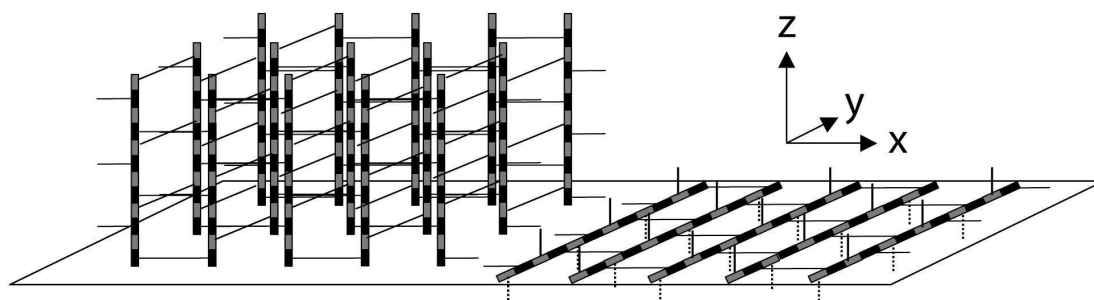
Un article de revue publié très récemment recense et détaille toutes ces données <sup>71</sup>.

### 1.1.3 Structure tridimensionnelle du peptidoglycane

Contrairement aux deux autres biopolymères de glycanes reliés entre eux par une liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  que sont la cellulose (chaîne de glucose) et la chitine (chaîne de GlcNAc) pour lesquels la structure tridimensionnelle est connue <sup>72, 73</sup>, la structure du peptidoglycane est encore débattue et

controversée <sup>74</sup>. Le manque de données peut être attribué à la taille importante de ce polymère ainsi qu'à son caractère non cristallin.

Cependant, de nombreux modèles se basant sur les propriétés biophysiques et la composition chimique du peptidoglycane ont été proposés à ce jour. Il en existe deux principaux : le modèle « superposé » (« layered model »), où les chaînes de glycanes sont parallèles à la surface de la cellule, et le modèle « en échafaudage » (« scaffold model ») où les chaînes glycaniques sont perpendiculaires à la surface bactérienne (Cf. Figure 1-5). Ces deux modèles seront commentés dans les paragraphes suivants. D'autres modèles, que nous ne détaillerons pas, ont été plus rarement décrits. Par exemple, un modèle stipule que les chaînes de glycanes sont orientées aléatoirement par rapport à la surface bactérienne <sup>75</sup>. Les images recueillies par microscopie à force atomique (ou AFM) laissent suggérées à Hayhurst *et al.* un modèle où les chaînes de glycanes s'organisent en cordes, qui elles-mêmes forment un câble qui s'enroule perpendiculairement au grand axe de la cellule <sup>47</sup>.



**Figure 1-5.** Représentation schématique (a) du modèle en échafaudage et (b) du modèle superposé. Cette illustration est tirée de Vollmer *et al.* <sup>74</sup>.

#### 1.1.3.1 Le modèle « superposé »

Les premiers modèles postulaient que la structure du peptidoglycane est semblable à celle de la chitine <sup>76-78</sup>. Dans la chaîne de chitine, les plans de deux sucres successifs s'orientent à 180 degrés les uns par rapport aux autres (symétrie C2, Cf. Figure 1-6). Les chaînes de glycanes, trop longues pour être disposées de façon verticale, sont parallèles à la surface bactérienne. Si ce modèle était appliqué au peptidoglycane, les chaînes de peptides pointeraient toutes dans la même direction, en dessous ou au dessus du plan formé par les chaînes glycaniques. Ce modèle a été réfuté dès les années 1970 <sup>68</sup>. Les modèles plus récents prennent en compte le groupe Lactyl porté par MurNAc qui gêne la rotation de ce sucre par rapport au GlcNAc. Environ huit sucres sont néces-

saies pour faire un tour (symétrie C4), ce qui implique que les peptides pointent dans des directions opposées suivant un motif hélicoïdal <sup>74</sup>. De nombreuses études sont en faveur de ce modèle (cryotomographie à électrons <sup>75</sup>, simulations <sup>79-81</sup> ...).

Les chaînes de glycanes peuvent s'organiser de différentes façons : (i) parallèles au grand axe de la cellule, (ii) perpendiculaires au grand axe, (iii) de façon hélicoïdale autour de la cellule, (iv) parallèles entre elles dans certaines zones et disposées de façon aléatoire dans d'autres, ou (v) de manière totalement aléatoire. Le fait que le peptidoglycane est plus élastique dans la direction du petit axe <sup>66</sup> tend à favoriser les modèles où les chaînes de peptides, plus flexibles, sont également alignées dans cette direction. Cependant, les résultats expérimentaux sont contradictoires.

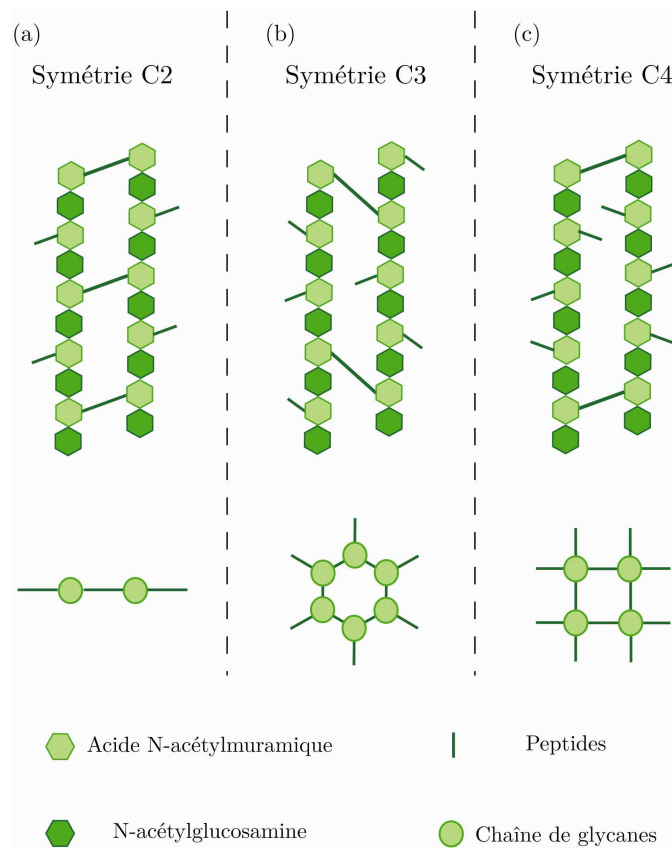


Figure 1-6. Représentation schématique des différents types de symétrie supposés pour le peptidoglycane. (a) symétrie C2 (chitine), (b) symétrie C3 (modèle « en échafaudage ») et (c) symétrie C4 (modèle « superposé »).

### 1.1.3.2 Le modèle « en échafaudage »

Le modèle en échafaudage suppose que les chaînes de glycanes sont orientées de façon verticale par rapport à la surface de la cellule. Ce modèle a

été initialement proposé suite à des simulations <sup>82, 83</sup> et à des études par RMN en phase liquide <sup>84</sup>. Cette étude suggère que la chaîne de glycanes forme une hélice ayant pour périodicité 6 sucres (symétrie C3). Le peptidoglycane aurait une structure en nid d'abeille. Les simulations de Knoch supposent que les acides 1,6-anhydro-muramique en bout de chaîne glycanique soient près de la membrane cytoplasmique, dans une zone où le degré de réticulation est important. A l'inverse, les GlcNAc se situent près de la membrane externe, dans une zone où la réticulation est peu abondante.

De nombreux arguments viennent contredire ce modèle. Par exemple, les chaînes de glycanes sont en moyenne plus longues que la couche de peptidoglycane. De plus, ce modèle, dans lequel les peptides sont orientés selon les deux axes de la cellule, ne tient pas compte des données obtenues par microscopie à force atomique <sup>66</sup> qui montrent que l'élasticité est plus importante selon le grand axe de la bactérie.

#### 1.1.4 *Le peptidoglycane, le système immunitaire et les antibiotiques*

La réponse immunitaire est l'activation du système immunitaire face à la reconnaissance du « non-soi ». On distingue l'immunité innée de l'immunité acquise. La première consiste en une série de systèmes de défense non spécifiques et représente la première barrière de défense, ne nécessitant pas de contact préalable avec l'agent pathogène et sans mémoire immunologique. L'immunité acquise, quant à elle, est un système de défense spécifique capable de lutter contre des micro-organismes avec lesquels il a déjà été mis en contact. Ce système se caractérise par une réponse durable et évolutive dans le temps et permet une protection à long terme.

Le système immunitaire inné est activé par la reconnaissance d'un motif moléculaire associé aux pathogènes (ou PAMPS pour « Pathogen Associated Molecular Pattern »), dont le peptidoglycane fait partie dans le cas d'infections bactériennes. Des protéines capables de reconnaître le peptidoglycane et possédant des propriétés bactéricides ont pu être identifiées (« toll like receptor 2 », « Nod 1 », « Nod 2 », ...) <sup>85, 86</sup>.

Cependant, le système immunitaire seul n'est pas toujours capable de faire face à une infection bactérienne. La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 a marqué le début de l'ère des antibiotiques et a permis de sauver de nombreuses vies. Les  $\beta$ -lactames, dont la pénicilline fait partie, imitent le dipeptide D-Ala-D-Ala terminal du précurseur du peptidoglycane et se lient de façon covalente au site actif des enzymes D-D-transpeptidases responsables de la synthèse du biopolymère. Néanmoins, de nombreuses bactéries ont trouvé un moyen d'échapper à l'effet des  $\beta$ -lactames

en développant une résistance à cet antibiotique. Il a donc été nécessaire de développer de nouvelles molécules. De nos jours, plus d'une centaine d'entre elles sont utilisables pour des applications thérapeutiques. La résistance grandissante des bactéries aux antibiotiques actuels restent cependant un problème majeur. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi que ceux de la biosynthèse de la paroi cellulaire font l'objet de nombreuses études et permettront peut-être de synthétiser des antibiotiques plus efficaces.

## 1.2 Les acides téichoïques

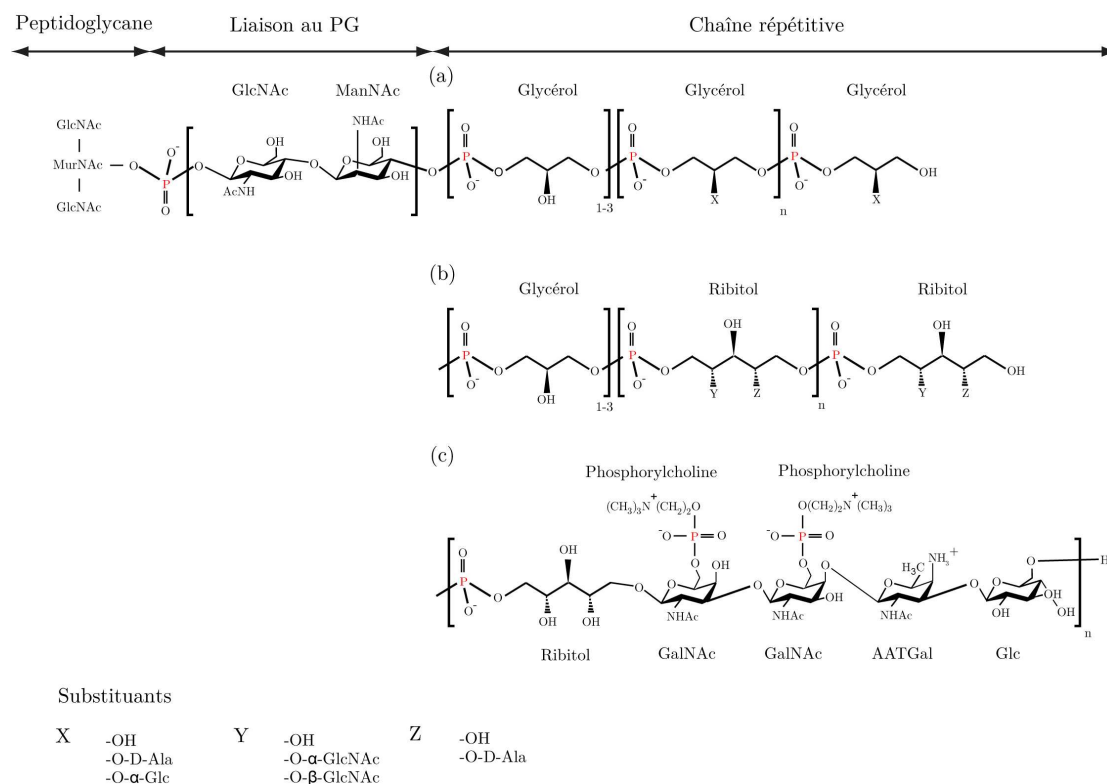
Les bactéries à Gram négatif possèdent une fine couche de peptidoglycane recouverte par la membrane externe. En revanche, les bactéries à Gram positif ne possèdent pas cette membrane externe mais ont développé d'autres structures à leur surface afin de les protéger. La plupart de ces bactéries incorporent dans leur enveloppe cellulaire des glycopolymères qui peuvent être soit liés de façon covalente au peptidoglycane (comme les acides téichoïques <sup>37, 38</sup>) soit ancrés dans la membrane (comme les acides lipotéichoïques <sup>87</sup>). Comme notre étude réalisée par RMN en phase solide porte uniquement sur les acides téichoïques (Cf. chapitres 2 et 3), nous consacrerons la suite de cette partie uniquement à ces polymères. La structure chimique de ces polymères est très variable et peut dépendre de l'espèce et même de la souche bactérienne. Cependant la structure chimique ainsi que les caractéristiques biophysiques sont très similaires entre les acides lipotéichoïques et téichoïques d'une même souche. Il a été proposé que les acides téichoïques s'orientent perpendiculairement à la surface de la cellule <sup>88</sup>. La moitié des acides téichoïques seraient en dehors du peptidoglycane et formerait une couche fibreuse <sup>89, 90</sup>.

Le réseau formé par les acides téichoïques a de nombreux rôles. Ces polymères seraient impliqués entre autre dans le maintien de l'homéostasie des cations métalliques, le trafic des ions vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule <sup>37</sup>, les mécanismes d'adhésion de la bactérie sur sa cellule hôte <sup>91</sup>, la formation de biofilms <sup>92</sup> etc.

### 1.2.1 Composition chimique des acides téichoïques

Les acides téichoïques ont été découverts dans les années 1950 par Armstrong *et al.* <sup>93</sup>. La diversité de structure chimique de ces polymères est très importante. Les monomères formant le squelette des acides téichoïques peuvent être des sucres de taille variée allant des trioses aux hexoses, sucres qui peuvent être réduits ou oxydés, en configuration pyranose ou furanose.

Ces monomères sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester anioniques afin de former de longues chaînes linéaires. Ils peuvent être décorés par de nombreux substituants tels que des sucres ou l'ester D-alanyl. Les acides téichoïques sont reliés au peptidoglycane de façon covalente en position 6 des acides N-acétylmuramiques<sup>94-96</sup> (Cf. Figure 1-7). Ce polymère zwitterionique peut constituer de 30 à 60 % de l'enveloppe cellulaire.



**Figure 1-7.** Composition chimique des acides téichoïques de (a) *B. subtilis* 168, (b) *S. aureus* et (c) *S. pneumoniae* R6. Les acides téichoïques sont liés de façon covalente en position 6 de l'acide N-acétylmuramique de la chaîne de peptide du peptidoglycane. Les divers substituants possibles X, Y et Z sont détaillés en bas de la figure.

Les acides téichoïques les plus fréquemment rencontrés de *B. subtilis* sont composés de poly-1,3-glycérol-phosphate décorés par des esters D-alanyl et des esters glucosyl. Le degré de polymérisation moyen de la chaîne est de 53 résidus (données recueillies sur les acides lipotéichoïques). Le degré de D-glucosylation dépend de l'âge de la cellule et de la concentration en phosphate de l'environnement dans lequel vit la bactérie. *B. subtilis* possède aussi de façon minoritaire des acides téichoïques composés de poly-(3-O- $\beta$ -glucose-N-acétylgalactosamine)<sup>97</sup>.



Les acides téichoïques de *S. aureus* possèdent quant à eux une chaîne linéaire constituée de poly-1,5-D-ribitol-phosphate glycosylés en position 4 du ribitol et décorés également par des esters D-alanyl<sup>98-100</sup>. Enfin, les acides téichoïques de *S. pneumoniae* ne possèdent pas d'esters D-alanyl mais des phosphorylcholines<sup>101</sup>.

### 1.2.2 Rôle des acides téichoïques au sein de la bactérie

#### 1.2.2.1 Pathogénicité des acides téichoïques

Les acides téichoïques jouent un rôle non négligeable dans l'adhésion et l'infection des cellules hôtes de la bactérie. Weidenmaier *et al.* ont montré par exemple que les acides téichoïques de *S. aureus* sont impliqués dans les interactions de la bactérie avec les cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte à infecter. En effet, l'inactivation de l'opéron *dlt*, responsable de l'insertion des esters D-alanyl sur les acides téichoïques<sup>102</sup>, conduit à une capacité réduite de *S. aureus* à se lier aux cellules épithéliales et endothéliales nasales du rat et à causer une infection<sup>91</sup>.

Les acides téichoïques peuvent aussi servir de site d'ancrage des protéines de l'enveloppe cellulaire. Par exemple, les protéines liant la choline (« Choline Binding Proteins » ou CBP), qui sont d'importants facteurs de virulence chez *S. pneumoniae*, sont ancrées sur les résidus choline des acides téichoïques<sup>103</sup>.

Les acides téichoïques semblent être également impliqués dans la formation de biofilms. Les biofilms sont des agrégats de cellules bactériennes adhérent entre elles et à une surface et créent un environnement protecteur pour les bactéries. Ils sont la cause majeure d'infections chroniques. La première étape de la formation de biofilms est l'adhésion des cellules bactériennes à une surface. Rice et Wickman ont étudié par RMN du phosphore 31 en phase solide l'adhésion des acides lipotéichoïques de *S. aureus* sur la cellulose, l'oxyde de titane et le peptidoglycane et ont proposé des modèles d'interactions entre les acides lipotéichoïques et les surfaces<sup>104, 105</sup>. Chez *S. pneumoniae*, les phosphorylcholines semblent être nécessaires au développement de biofilms. Si les phosphorylcholines sont remplacées par des phosphoryléthanolamines, la formation de biofilms est réduite de 50 %<sup>92</sup>.

Enfin, les acides téichoïques modulent l'efficacité des agents antimicrobiens. Les peptides antimicrobiens cationiques (ou « Cationic Antimicrobial Peptides », CAMPs) sont produits par les cellules animales et humaines afin de lutter contre les infections bactériennes, mais aussi par de nombreuses bac-

téries afin d'éliminer leurs concurrents <sup>106</sup>. La plupart de ces molécules antimicrobiennes sont positivement chargées afin d'assurer une affinité importante pour la membrane cytoplasmique bactérienne, qui elle est négativement chargée. Peschel *et al.* ont montré que l'inactivation du gène *dlt* chez *S. aureus* entraînait une sensibilité accrue aux CAMPs tels que la nisine <sup>107</sup> ainsi qu'une susceptibilité altérée aux antibiotiques comme la vancomycine <sup>108</sup>. Ces nouvelles propriétés résulteraient de la charge anionique globale plus importante de la cellule Dlt<sup>-</sup>. Les bactéries modifieraient leurs acides téichoïques avec des esters D-alanyl positivement chargés afin d'acquérir une résistance partielle aux CAMPs et antibiotiques <sup>109, 110</sup>.

### 1.2.2.2 Homéostasie et assimilation des cations métalliques

Peu après la découverte des acides téichoïques <sup>111</sup>, il a été suggéré qu'une de leur fonction est d'interagir avec des cations divalents tels que Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>. Différents modèles d'interactions ont été proposés. L'un des modèles propose une interaction monodentée où le cation est lié à un phosphodiester et un contre-ion (acides téichoïques possédant beaucoup d'esters D-alanyl) <sup>112</sup> et l'autre une interaction bidentée où le cation est lié à deux phosphodiesters (acides téichoïques possédant peu d'ester D-alanyl) <sup>113</sup>. Plus récemment, Rice *et al.*, en combinant RMN du phosphore en phase solide et calculs DFT, rejettent les modèles précédents et proposent, dans le cas d'acides téichoïques riches en esters D-alanyl, un modèle bidenté, où le cation est lié à deux oxygènes portés par le même phosphodiester <sup>114, 115</sup>.

Le peptidoglycane possède également des sites anioniques pouvant interagir avec les cations métalliques tels que les  $\gamma$ -carboxylates des acides glutamiques et des acides diaminopiméliques ou les carboxylates des alanines en bout de chaîne peptidique. La contribution du peptidoglycane et des acides téichoïques aux interactions avec les cations est variable <sup>116, 117</sup>. Le peptidoglycane et les acides téichoïques fonctionneraient de concert afin de maintenir l'homéostasie cationique cellulaire et de permettre le trafic des cations métalliques de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et inversement <sup>37</sup>.

Il a également été proposé que les acides téichoïques permettent de moduler l'activité des autolysines et de définir les propriétés électromécaniques de la paroi cellulaire. Ils peuvent également interagir spécifiquement ou non avec les récepteurs de la cellule hôte afin de déclencher une réponse immunitaire <sup>37</sup>.

Une partie du travail de thèse relaté dans ce manuscrit a porté sur l'étude du peptidoglycane et des acides téichoïques présents chez les bactéries

à Gram positif *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. pneumoniae* par RMN en phase solide. Nous avons également étudié les interactions entre les acides téichoïques de *S. pneumoniae* et l'une de ses protéines de surface impliquée dans la virulence bactérienne. Ces recherches font l'objet des deux chapitres suivants.

## Chapitre 2

---

Caractérisation de la paroi cellulaire bactérienne et  
de ses interactions avec les cations métalliques



## 2. Caractérisation de la paroi cellulaire bactérienne et de ses interactions avec les cations métalliques

La RMN en phase solide biomoléculaire a fait d'énormes progrès ces dernières années, jusqu'à devenir une technique très prometteuse pour la caractérisation structurale de biopolymères (Cf. Introduction générale). Seules de rares études utilisant la RMN en phase solide ont été menées jusqu'à présent sur des échantillons de paroi cellulaire bactérienne. Des expériences de type REDOR ont permis d'obtenir des informations sur la réticulation et sur les ponts interpeptidiques du peptidoglycane<sup>118, 119</sup> ainsi que d'étudier ses modifications suite à une exposition aux antibiotiques<sup>120, 121</sup>. L'étude d'échantillons d'acides téichoïques et lipotéichoïques par RMN du phosphore a également permis de mettre en lumière l'adsorption de ces échantillons sur différentes surfaces et le mode de chélation par des cations divalents<sup>104, 105, 114, 115</sup>. Cependant, toutes ces études portaient sur des échantillons lyophilisés. Dans ce chapitre, dans la continuité des travaux publiés par Kern *et al.* sur *E. coli*<sup>122</sup>, nous montrons que la RMN en phase solide est parfaitement adaptée à l'étude d'échantillons hydratés de sacculi entiers de bactéries à Gram positif (*B. subtilis*, *S. aureus* et *S. pneumoniae*). La combinaison de la RMN du carbone et du phosphore permet, après attribution du peptidoglycane et des acides téichoïques, d'obtenir des informations sur les propriétés dynamiques de ces différents peptidoglycanes ainsi que sur les interactions entre les métaux et la paroi cellulaire bactérienne.

### 2.1 Caractérisation de la paroi cellulaire bactérienne

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, les bactéries à Gram positif possèdent deux différences principales avec les bactéries à Gram négatif : leur peptidoglycane est plus épais et la paroi cellulaire est constituée d'un polymère supplémentaire, les acides téichoïques. Nous nous sommes donc intéressés à ces deux particularités. Le but de cette étude est de déterminer si l'épaisseur du peptidoglycane joue un rôle sur la structure de la paroi cellulaire ainsi que sur sa dynamique. Nous avons également comparé l'effet du degré de réticulation et de la longueur des chaînes de glycanes, variables selon les espèces bactériennes, sur la dynamique du peptidoglycane. Nous nous sommes aussi intéressés à la structure et dynamique des acides téichoïques.

Cette étude a été conduite sur des échantillons de peptidoglycane mais aussi de paroi cellulaire entière.

### 2.1.1 Caractérisation du peptidoglycane de *B. subtilis* et *S. aureus*

#### 2.1.1.1 Préparation des échantillons

Tous les échantillons de peptidoglycane et de paroi cellulaire utilisés dans cette étude ont été enrichis isotopiquement en carbone 13 et azote 15. Pour ce faire, les cellules bactériennes *Bacillus subtilis* 168 de la collection américaine (ATCC 23857) ont été cultivées dans un milieu M9 enrichi en carbone 13 et azote 15 et contenant du chlorure de manganèse à une concentration de 0,1 mM. Les bactéries *S. aureus* (ATCC 25923) ont été cultivées dans un milieu SILANTES enrichi en carbone 13 et azote 15 ([www.silantes.com](http://www.silantes.com)). Enfin, *Bacillus subtilis* W23 a été cultivée dans un milieu LB.

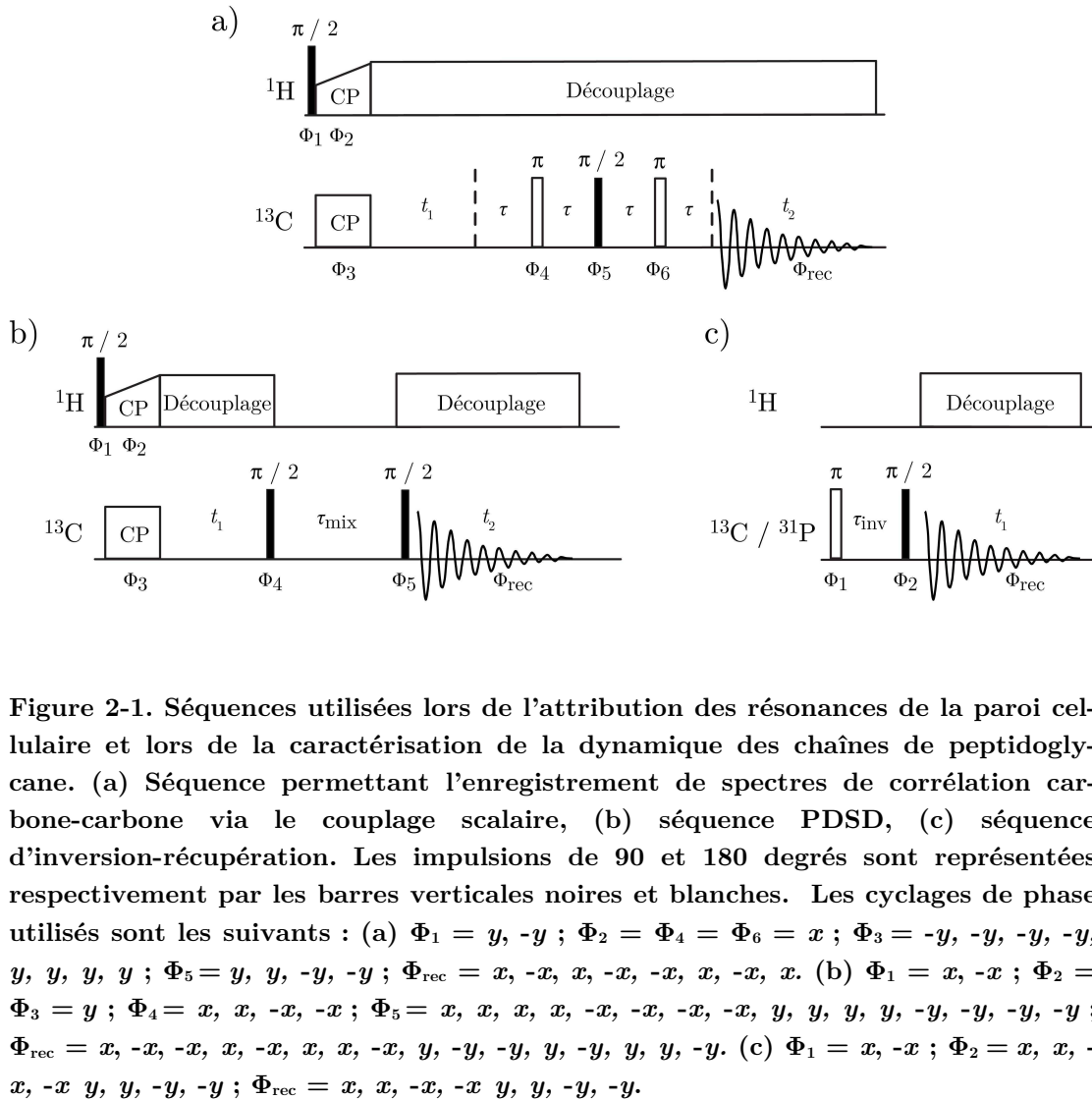
Les cellules ont été recueillies par centrifugation une fois leur densité optique de 0,7 atteinte (à 600 nm) et mises à bouillir dans du SDS (4%). Le détergent a ensuite été éliminé grâce à de l'eau milli-Q. Les échantillons de paroi cellulaire ont été obtenus grâce à un procédé publié précédemment<sup>85, 122, 123</sup>. Cette procédure maintient intacte l'enveloppe cellulaire (ou sacculus) formée par le peptidoglycane et les acides téichoïques, alors que les acides lipotéichoïques sont éliminés grâce à un traitement au SDS<sup>43, 89</sup>. Ce traitement permet également d'éliminer les phospholipides constituant la membrane cytoplasmique. L'hydrolyse acide de la paroi cellulaire permet ensuite d'éliminer les acides téichoïques en rompant la liaison entre le groupe phosphate et le carbone C<sub>6</sub> de l'acide N-acétylmuramique. De cette façon, des échantillons hydratés et uniformément marqués de peptidoglycane, avec ou sans acides téichoïques, ont pu être obtenus pour *B. subtilis* et *S. aureus*.

Les échantillons purifiés de peptidoglycane ont ensuite été ultracentrifugés et resuspendus dans une solution tampon HEPES à pH 7,5. Ces étapes ont été répétées jusqu'à ce que le pH du surnageant soit stable et égale à 7,5. Une suspension hydratée et ayant l'aspect d'un gel a ensuite été introduite dans un rotor de 4 mm (Bruker) ou de 3,2 mm (Varian) de diamètre par centrifugation.

Les échantillons lyophilisés de paroi cellulaire (constituée de peptidoglycane et d'acides téichoïques) ont été resuspendus dans une solution tampon HEPES à pH 7,5 et traités de la même façon que le peptidoglycane.

### 2.1.1.2 Attribution du peptidoglycane

Avant de procéder à son attribution, nous avons voulu nous assurer que le peptidoglycane des bactéries à Gram positif n'était pas affecté par l'élimination des acides téichoïques ou par le traitement acide permettant de les supprimer de l'échantillon. Pour ce faire, des spectres de corrélation carbone-carbone par couplage scalaire ont été enregistrés à la fois sur des échantillons de peptidoglycane et de paroi cellulaire de deux des bactéries à Gram positif que nous avons étudiées : *B. subtilis* et *S. aureus*.



La séquence d'impulsions utilisée se base sur la séquence INADEQUATE refocalisée<sup>124</sup> (Cf. Figure 2-1 (a)). Cependant, l'évolution double-quanta est remplacée par une évolution simple-quanta, ce qui a pour avantage



d'augmenter l'intensité du signal par un facteur 2, mais introduit des pics diagonaux. Le résultat obtenu est très similaire à l'expérience UC2QF COSY publiée récemment <sup>125</sup>. La superposition des spectres de peptidoglycane et de paroi cellulaire montrent que les déplacements chimiques des résonances du peptidoglycane ne sont pas affectés par l'absence des acides téichoïques. Cette comparaison valide le fait que la structure du peptidoglycane n'est pas altérée par l'élimination des acides téichoïques suite à l'hydrolyse acide, et ce chez aucune des deux espèces étudiées.

Nous avons ensuite comparé ces spectres avec ceux enregistrés précédemment sur une bactérie à Gram négatif, *E. coli*. En se basant sur la longueur moyenne des chaînes de peptides des trois espèces dans une conformation étendue, nous pouvons considérer que la distance entre deux chaînes de glycanes est supérieure à 30 Å, quelle que soit la bactérie considérée. Les déplacements chimiques du carbone devraient donc principalement être influencés par la structure locale à l'intérieur d'une même chaîne de glycanes ou de peptides plutôt que par la présence de chaînes avoisinantes. La présence d'une couche épaisse de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif ne devrait pas affecter les déplacements chimiques. Les spectres 2D de résonance du carbone des deux bactéries à Gram positif ont donc été attribués et comparés à celui obtenu précédemment sur l'échantillon de peptidoglycane de la bactérie à Gram négatif *E. coli* <sup>122</sup> (Cf. Figure 2-2 (a)). La comparaison de ces trois spectres ne met en lumière que peu de différences. Dans le cas de *B. subtilis*, des pics de corrélation supplémentaires sont observés dans la région correspondant aux CO/C <sub>$\alpha$</sub> , aux CO/C <sub>$\gamma$</sub>  ou aux CO/C <sub>$\epsilon$</sub>  de l'acide glutamique ou de l'acide méso-diaminopimélique. Ces pics sont attribués à une fraction des acides diaminopiméliques ayant été amidés <sup>48, 50</sup>. Dans le cas de *S. aureus*, trois différences sont observables. D'abord, le spectre de *S. aureus* possède un pic très intense correspondant aux cinq glycines qui constituent le pont interpeptidique. Ensuite, le spectre révèle un pic attribué à la lysine, qui remplace l'acide diaminopimélique dans la chaîne peptidique. Enfin, le déplacement chimique de l'acide glutamique est légèrement modifié. En effet, ce résidu est presque totalement amidé et est transformé en glutamine (Cf. tableau récapitulatif des déplacements chimiques en annexe A).

Ceci montre donc que l'organisation locale du peptidoglycane est similaire chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif que nous avons étudiées. Les différences observées ne sont dues qu'aux légères variations de la composition chimique du peptidoglycane des différentes espèces étudiées.

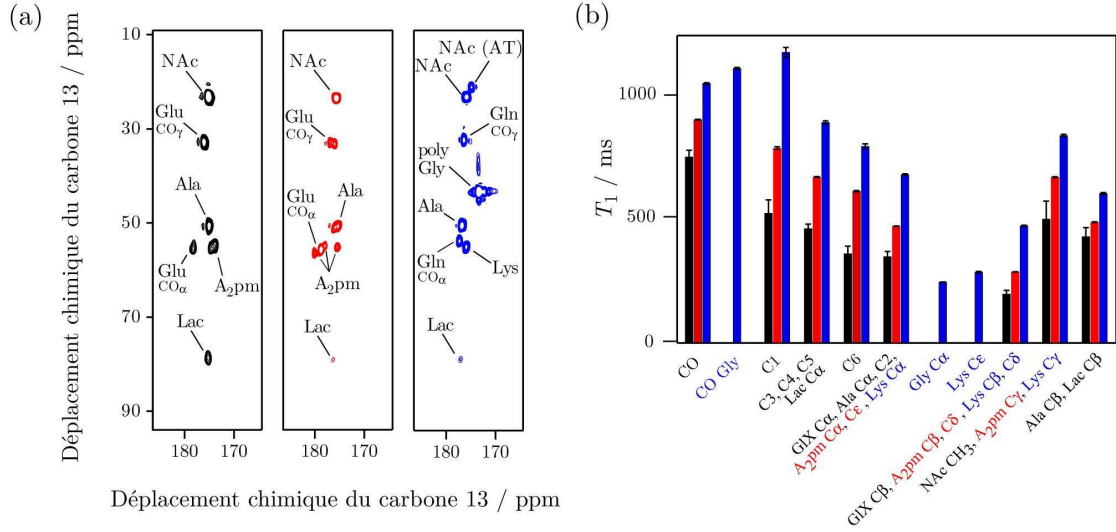
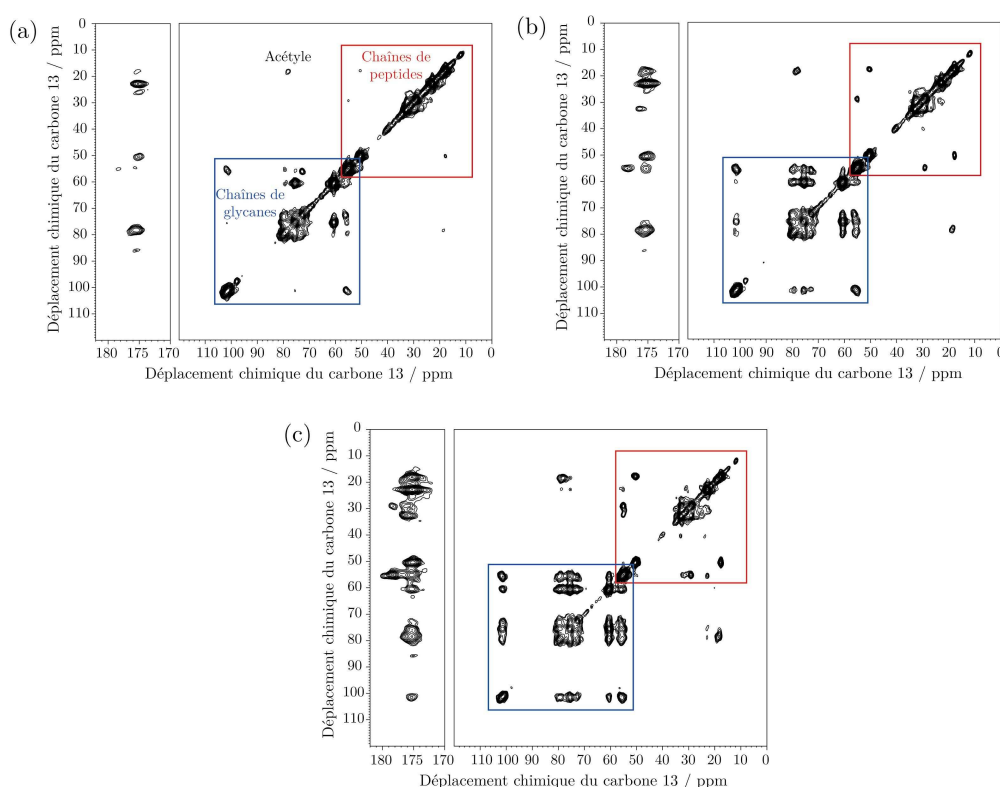


Figure 2-2. Comparaison (a) des pics de corrélation entre les carboxyles et les carbones aliphatiques obtenus sur des spectres 2D via le couplage scalaire et (b) des constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  mesurées sur un spectromètre Bruker 9,4 T équipé d'une sonde double-résonance 4 mm avec  $\omega_{\text{H}}/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_{\text{r}}/2\pi = 9$  kHz. La température du gaz « bearing » était de 268 K, ce qui correspond à 285 K au niveau de l'échantillon. Les spectres 2D ont été enregistrés sur le peptidoglycane de *E. coli* (en noir) et sur la paroi cellulaire de *B. subtilis* W23 (en rouge) et de *S. aureus* (en bleu). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 500  $\mu\text{s}$ , une force de champ rf moyen sur la voie proton de 69 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Pendant l'évolution sous le couplage scalaire et l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. Le champ rf sur la voie carbone utilisé lors des impulsions a été calibré à 60 kHz. Les périodes d'évolution sous le couplage scalaire ont été synchronisées avec la vitesse de rotation et calibrées à 2 ms, sauf pour les expériences réalisées sur *E. coli*, où cette période d'évolution était de 1,667 ms. La fenêtre spectrale était de 24 kHz dans les deux dimensions. Les temps d'acquisition ont pu varier de 15 à 18 ms dans la dimension directe et de 5 à 7 ms dans la dimension indirecte. Une détection quadrature de type States-TPPI a été utilisée <sup>128</sup>. Le temps entre deux scans était de 1,5 s pour *E. coli* et *S. aureus* et de 2 s pour *B. subtilis*, conduisant à un temps expérimental total de 18 à 62 h en fonction de la souche étudiée. Les constantes de temps de relaxation longitudinale du carbone ont été mesurées par inversion-récupération, mesures effectuées sur des échantillons sans acides téichoïques (même code de couleur). Le temps entre deux scans dans cette expérience était de 4 à 10 s, de façon à être au moins cinq fois supérieur aux constantes de temps mesurées. Les autres paramètres ont été réglés comme lors des expériences à deux dimensions.

### 2.1.1.3 Caractérisation de la dynamique du peptidoglycane

Une fois l'étape nécessaire d'attribution réalisée, nous nous sommes intéressés à la dynamique du peptidoglycane et à l'influence des différentes caractéristiques de la paroi cellulaire sur sa dynamique. Pour ce faire, tout comme Kern *et al.* sur la bactérie *E. coli*, nous avons tout d'abord enregistré des expériences en deux dimensions via le couplage dipolaire. La séquence utilisée est la séquence PDSO ou « Proton Driven Spin Diffusion » (Cf. Figure 2-1 (b)). Cette séquence étant expliquée dans le chapitre 6 portant sur le recouplage en RMN en phase solide, le lecteur est invité à le consulter pour plus de détails.



**Figure 2-3.** Spectres de corrélation carbone-carbone de type PDSO enregistrés sur un échantillon de peptidoglycane de *B. subtilis* W23 uniformément marqué en carbone 13 et azote 15 avec un temps de mélange de (a) 10 ms, (b) 30 ms et (c) 100 ms. Les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales que les spectres présentés en Figure 2-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Les temps d'acquisition étaient de 15 ms dans la dimension directe et de 7 ms dans la dimension indirecte. 64 scans ont été accumulés après 16 « dummy » scans. Le temps expérimental total était de 10 h. Une fenêtre d'apodisation de type « cosine-bell » a été appliquée dans la dimension indirecte. La région correspondant aux chaînes de peptides est encadrée en rouge et celle correspondant aux chaînes de glycanes en bleu.

Cependant, dans notre cas, il est important de savoir que le couplage dipolaire étant à l'origine des pics de corrélation, nous pouvons considérer de façon grossière que pour un temps de contact donné entre les différents spins, plus les pics sont intenses, moins les chaînes portant les atomes correspondants sont flexibles et inversement. Des spectres ont été enregistrés sur les bactéries *B. subtilis* W23 (Cf. Figure 2-3). La lecture de ces spectres de corrélation a révélé une mobilité relativement élevée du peptidoglycane. En effet, des pics de corrélations n'apparaissent que pour de longs temps de contact. Ceci est particulièrement vrai pour les chaînes de peptides pour lesquelles des motifs de corrélation complets intrarésidus n'ont pas pu être observés, même pour des temps de contact de 100 ms. Les chaînes de glycanes, quant à elles, semblent plus rigides puisque un motif complet de corrélation a pu être obtenu pour un temps de mélange de 30 ms.

Afin d'avoir plus de détails sur la dynamique locale du réseau constitué par le peptidoglycane, une autre méthode a ensuite été utilisée : les constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  ont été mesurées par inversion-récupération sur le peptidoglycane de *B. subtilis* W23 et de *S. aureus*. Lors de ces expériences, l'aimantation des atomes de carbone est tout d'abord inversée par une impulsion de 180 degrés (« inversion ») avant que l'aimantation ne revienne ensuite librement à l'équilibre pendant un délai variable  $\tau_{\text{inv}}$  (« récupération »). Pour pouvoir finalement détecter l'aimantation, celle-ci est basculée dans le plan transverse par une impulsion de 90 degrés (Cf. Figure 2-1 (c)).

Les valeurs de  $T_1$  mesurées ont été comparées aux valeurs précédemment enregistrées chez *E. coli*<sup>122</sup> (Cf. Figure 2-2 (b)). Ces mesures indiquent une augmentation globale des constantes de temps  $T_1$  pour toutes les résonances du peptidoglycane de *B. subtilis* comparées à celles de *E. coli* et pour toutes les résonances du peptidoglycane de *S. aureus* comparées à celles de *B. subtilis*. Afin de pouvoir tirer une conclusion sur la dynamique relative de ces différentes espèces, la dépendance des constantes de temps  $T_1$  à la température, et donc à la flexibilité, a d'abord été étudiée chez *B. subtilis* : de façon générale, une plus grande température, et donc une flexibilité plus importante, entraîne une baisse des constantes de temps de relaxation (Cf. Figure 2-4). Les résonances des carboxyles et carbonyles sont les seules à ne pas présenter de dépendance à la température.

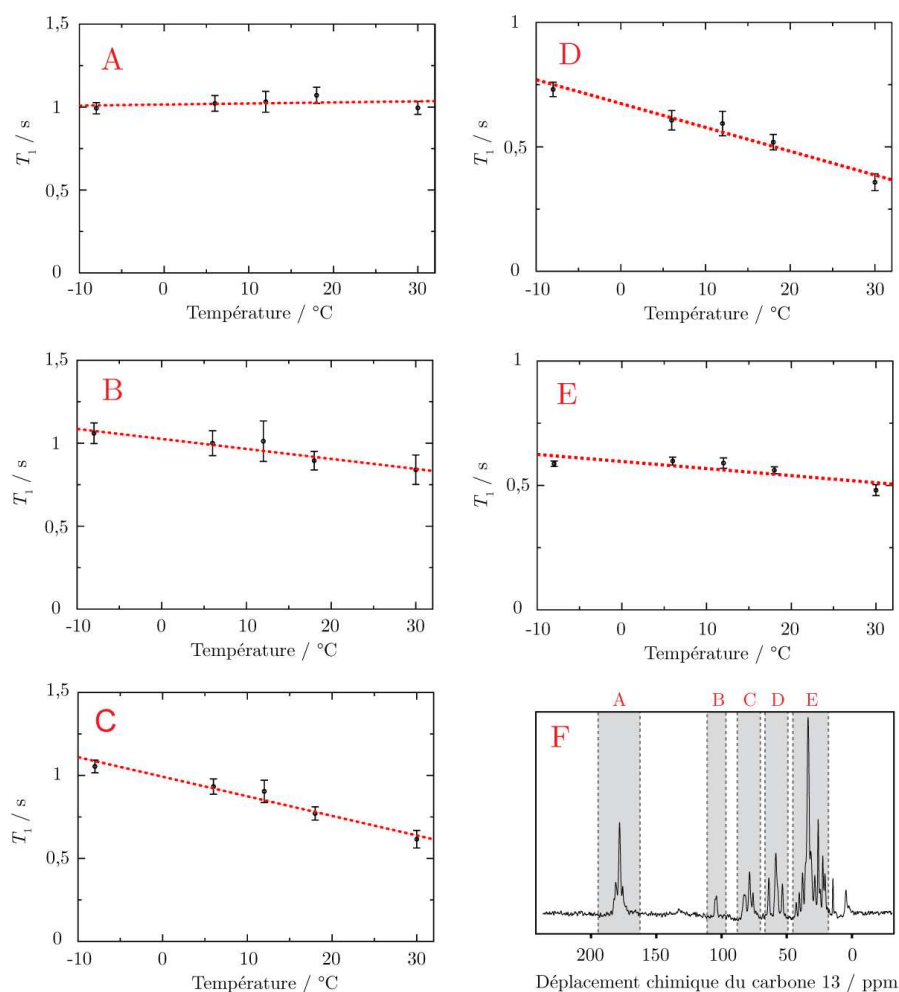
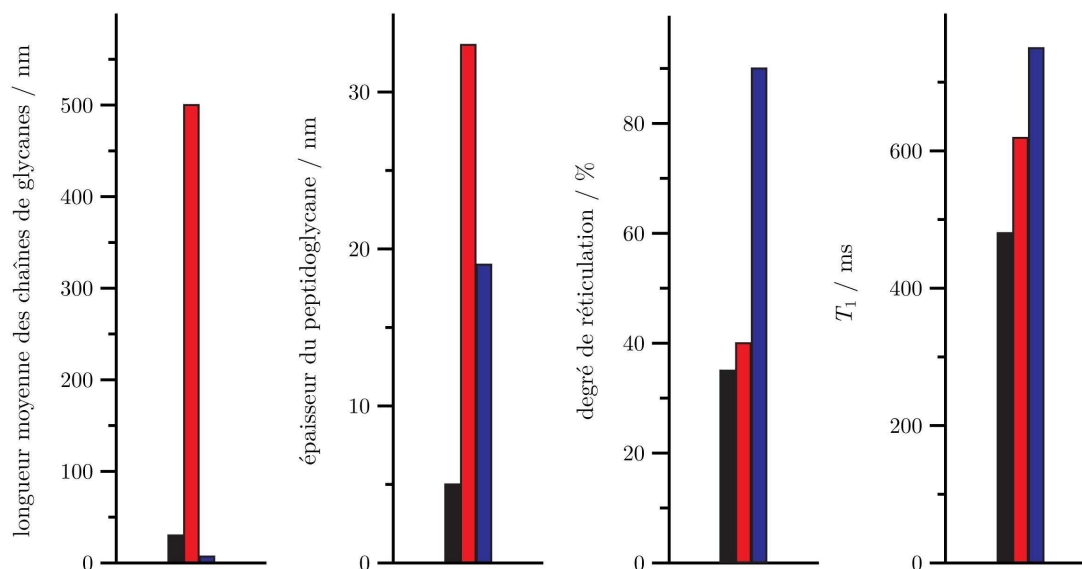


Figure 2-4. Dépendance à la température des constantes de temps de relaxation  $T_1$  du carbone mesurées sur un spectromètre Varian 14,1 T équipé d'une sonde triple-résonance 3,2 mm par inversion-récupération avec  $\omega_H/2\pi = 600$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 12$  kHz sur un échantillon de paroi cellulaire de *B. subtilis* 168. La fenêtre spectrale est de 40 kHz. Le temps d'acquisition était de 14 ms et le temps entre chaque scan de 5 s. Le champ rf sur la voie carbone a été calibré à 46 kHz et sur la voie proton à 90 kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type TPPM<sup>129</sup> a été utilisé, avec une force de champ rf de 90 kHz. Les constantes de temps longitudinales ont été extraites pour 5 groupes de pics comme illustré sur le spectre monodimensionnel en F (zone A : résonances des carboxyles et carbonyles, zones B et C : résonances des glycanes, zones D et E : résonances des aliphatiques). La ligne rouge en pointillé suit la tendance qu'ont les constantes de temps de relaxation à diminuer en fonction de la température.

Il découle de cette étude de variation de température que la flexibilité du peptidoglycane de *E. coli* est plus grande que celle du peptidoglycane de *B.*

*subtilis*, qui est elle-même plus importante que celle de *S. aureus*. Le peptidoglycane de *S. aureus* est le plus rigide des peptidoglycanes étudiés ici.

Comment expliquer ces variations de constantes de temps de relaxation ? Peuvent-elles être reliées aux paramètres structuraux tels que le degré de réticulation ou la longueur des chaînes de glycanes ? En effet, comme résumé dans le précédent chapitre (le chapitre 1), le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif et celui des bactéries à Gram positif diffèrent tout d'abord par leur épaisseur (environ 5 et 30 nm, respectivement <sup>62-66</sup>). La longueur moyenne des chaînes de glycanes est également très variable selon les espèces (environ 30 monomères de disaccharides dans le cas de *E. coli*, plus de 500 monomères pour *B. subtilis* et environ 6 pour *S. aureus* <sup>36, 45-49</sup>), tout comme le degré de réticulation, qui est le plus important chez *S. aureus* <sup>60</sup>. Ces différentes caractéristiques sont comparées entre elles et avec les constantes de temps de relaxation longitudinale mesurées sur les trois espèces en Figure 2-5. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la mesure des constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  (Cf. Figure 2-2 et Figure 2-5) montre que la flexibilité du peptidoglycane de *S. aureus* est moindre que celle du peptidoglycane de *B. subtilis*, qui est elle-même moins importante que celle de *E. coli*. Le fait que nos expériences indiquent que *S. aureus* possède le peptidoglycane le plus rigide est assez étonnant. En effet, cette espèce possède la chaîne de glycanes la plus courte, élément apportant pourtant le plus de rigidité au peptidoglycane. De plus, la présence d'un pont interpeptidique composé de cinq glycines devrait apporter de la flexibilité au système. Nous en concluons donc que le degré important de réticulation chez *S. aureus* l'emporte sur la longueur de la chaîne de glycanes et sur la nature du pont interpeptidique et cause une diminution majeure de la flexibilité globale du peptidoglycane. Il semble que la flexibilité importante des glycines ne soit pas propagée au reste de la chaîne de peptides qui demeure plus rigide chez *S. aureus* que chez *E. coli* et *B. subtilis*, où la réticulation a lieu directement, sans pont interpeptidique. La présence et la nature du pont interpeptidique n'influence donc pas la flexibilité du peptidoglycane, si celui-ci possède un fort taux de réticulation. Une estimation grossière du changement de la dynamique du peptidoglycane parmi les différentes espèces a pu être obtenue en comparant les variations de constantes de temps de relaxation  $T_1$  en fonction de la température (Cf. Figure 2-4). L'augmentation de la dynamique observée entre le peptidoglycane de *S. aureus* et de *E. coli* peut globalement être comparée à une augmentation de température de 30 K.



**Figure 2-5.** Variation des paramètres structuraux et des constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  du carbone pour trois bactéries : *E. coli* (en noir), *B. subtilis* (en rouge) et *S. aureus* (en bleu). Les constantes de temps  $T_1$  correspondent aux valeurs moyennes mesurées sur toutes les résonances de carbone de chaque espèce. Elles sont mesurées comme expliqué dans la Figure 2-2.

### 2.1.2 Caractérisation des acides téichoïques

Selon la littérature, les acides téichoïques jouent un rôle important au sein de la cellule. Ils seraient notamment impliqués dans le trafic des ions de l'intérieur à l'extérieur de la cellule et inversement <sup>37</sup>. Cependant, les études menées jusque maintenant portaient sur des échantillons d'acides lipotéichoïques isolés et lyophilisés, les acides téichoïques étant difficiles à extraire de la paroi. Dans cette étude, nous proposons d'étudier les acides téichoïques hydratés au sein de la paroi cellulaire. Nous avons dans un premier temps procédé à leur attribution, ce qui nous a ensuite permis d'étudier leur flexibilité.

#### 2.1.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de paroi cellulaire de *B. subtilis* et de *S. aureus* ont été préparés comme décrit plus haut. *Streptococcus pneumoniae* R6 a été cultivée dans un milieu C+Y <sup>130</sup> contenant du glucose enrichi en carbone. Ceci a conduit à un marquage isotopique des acides téichoïques principalement.

Les acides téichoïques contenant de nombreux atomes de carbone mais aussi de phosphore (Cf. chapitre précédent), nous avons pu étudier ce poly-

mère à la fois par la RMN du carbone (les acides téichoïques sont uniformément marqués) mais aussi par la RMN du phosphore. L'avantage de cette dernière technique est qu'elle ne nécessite pas de marquage isotopique, l'abondance naturelle du phosphore 31 étant de 100%.

### 2.1.2.2 Caractérisation par la RMN du carbone

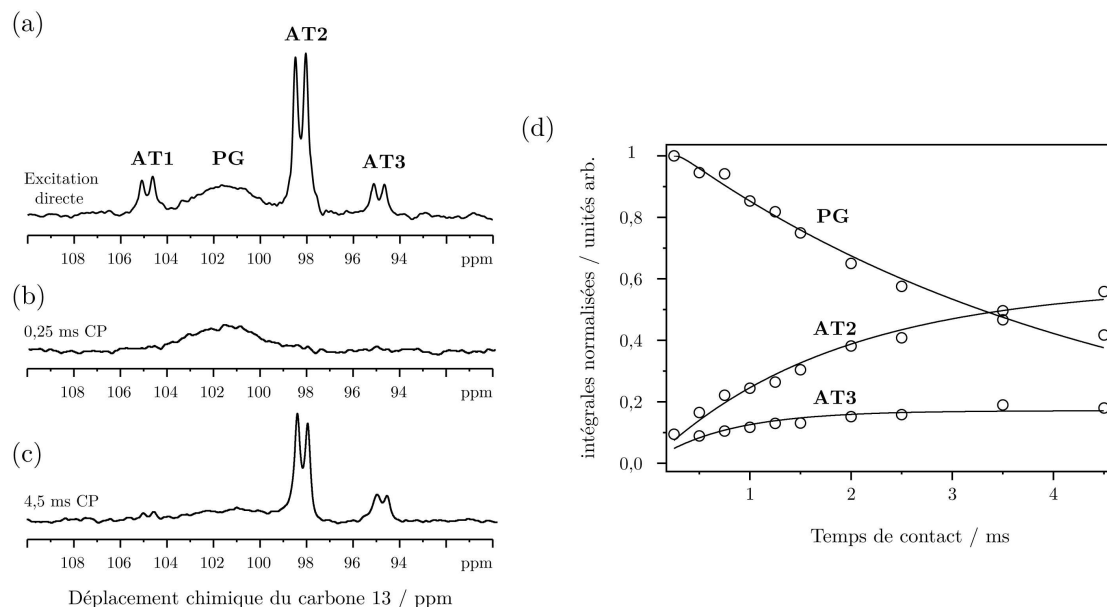
Nous avons dans un premier temps attribué les carbones des acides téichoïques. Leurs résonances ont pu être rapidement identifiées par comparaison des spectres de corrélation carbone-carbone des sacculi avec et sans acides téichoïques. Elles ont pu être attribuées en utilisant à la fois des motifs de corrélation caractéristiques et des déplacements chimiques clés (Cf. tableau récapitulatif en annexe B). En effet, leurs déplacements chimiques sont comparables à ceux recueillis par RMN en phase liquide sur des acides lipotéichoïques extraits ou sur des fragments de polysaccharides de la paroi cellulaire <sup>131</sup>.

L'étude des spectres de résonance du carbone a également révélé que les acides téichoïques peuvent être divisés en deux parties, selon leur flexibilité. La fraction la plus rigide des acides téichoïques peut être observée dans les expériences de polarisation croisée du proton vers le carbone. Cependant, des temps de contacts pouvant atteindre plusieurs millisecondes sont nécessaires afin d'obtenir des signaux ayant une intensité maximale alors que le peptidoglycane peut être polarisé en seulement 250  $\mu$ s (Cf. Figure 2-6 (b) et (c)). Ceci est dû au fait que les couplages dipolaires sont partiellement moyennés par la dynamique moléculaire ayant lieu à l'échelle du kilohertz dans cette fraction d'acides téichoïques. Ce moyennage est cependant tellement important que les acides téichoïques apparaissent comme des pics fins où le couplage scalaire <sup>1</sup>J carbone-carbone est complètement résolu.

La deuxième partie des acides téichoïques possède une mobilité encore plus importante. Dans ce cas, les couplages dipolaires sont complètement moyennés, raison pour laquelle cette fraction d'acides téichoïques n'est visible que sur les spectres enregistrés par excitation directe (Cf. Figure 2-6 (a)). Le couplage <sup>1</sup>J proton-carbone peut même être résolu en l'absence de découplage hétéronucléaire. Comme les échantillons ont été centrifugés et rincés abondamment plusieurs fois, ces pics très résolus ne peuvent pas provenir de fragments d'acides téichoïques qui se seraient dégradés, ces fragments étant très solubles. Une telle résolution ne peut donc être que le résultat d'une dynamique extrêmement importante des chaînes entières d'acides téichoïques. En comparant les intensités à l'équilibre des résonances du peptidoglycane et des acides téichoïques obtenues par des expériences de montée en polarisation avec



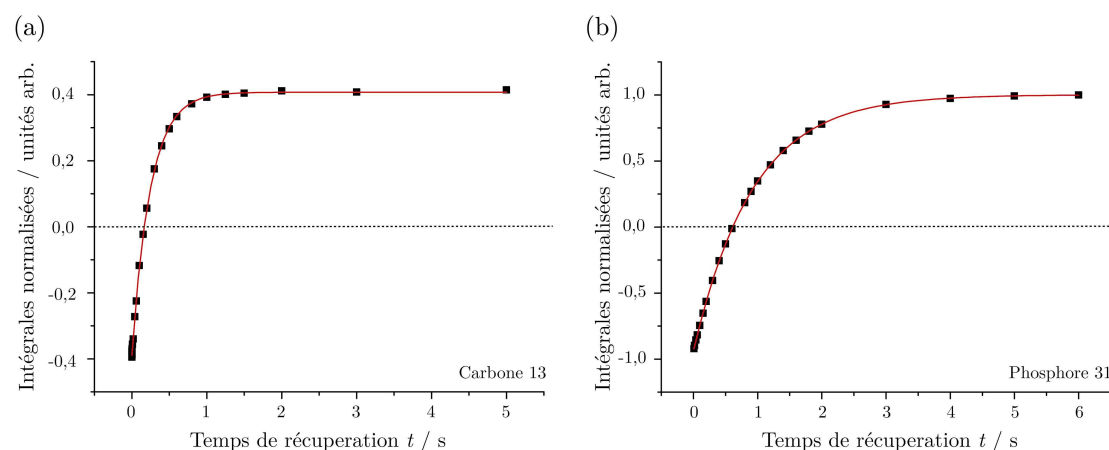
les intensités de ces mêmes résonances obtenues par excitation directe, la quantité d'acides téichoïques possédant une dynamique très importante a pu être estimée à environ 50% (Cf. Figure 2-6 (d)).



**Figure 2-6.** Comparaison des spectres de résonance du carbone, centrés sur la région des carbones  $\text{C}_1$  des sucres, enregistrés sur la paroi cellulaire de *B. subtilis* 168 par (a) excitation directe, (b) polarisation croisée mettant en contact les protons et les carbones pendant 250  $\mu\text{s}$  et (c) polarisation croisée mettant en contact les protons et les carbones pendant 4,5 ms. La région choisie est représentative de toutes les autres dans le spectre entier. (d) Courbes de montée en polarisation des résonances du carbone du peptidoglycane (PG) et des acides téichoïques (AT) de *B. subtilis* 168. Les intégrales ont été extraites pour les différentes régions illustrées sur le spectre (a). Aucune intégrale n'a pu être extraite pour le signal AT1 car le signal sur bruit pour cette résonance était trop faible. L'ensemble de ces expériences ont été enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales que les spectres présentés en Figure 2-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Le temps d'acquisition était de 30 ms pour les expériences de polarisation croisée et de 50 ms pour l'expérience d'excitation directe. Une fenêtre d'apodisation de type exponentielle de 20 Hz a été appliquée à tous les spectres. Le temps entre chaque scan était de 3 s.

Il est au premier abord surprenant que ces deux populations d'acides téichoïques possédant des dynamiques si différentes ne soient pas discernables dans les expériences d'inversion-récupération du carbone ou du phosphore (Cf. Figure 2-7). En effet, l'analyse de ces expériences ne révèle qu'un comportement mono-exponentiel du retour à l'équilibre de la polarisation. Ceci peut s'expliquer par le fait que les expériences de polarisation croisée et d'inversion-récupération sont toutes deux sensibles au moyennage des interactions dipolai-

res par la dynamique, mais pas à la même échelle temporelle. Les expériences d'inversion-récupération sont affectées par une dynamique ayant lieu à l'échelle du Mégahertz, alors que les expériences de polarisation croisée sont sensibles à un moyennage des couplages dipolaires à l'échelle du kilohertz.



**Figure 2-7.** Courbes d'inversion-récupération de l'aimantation (a) des carbones et (b) des phosphores pour la résonance du ribitol des acides téichoïques. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences présentées en Figure 2-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Le temps d'acquisition était de 30 ms en (a) et de 50 ms en (b). Les impulsions rf large bande sur la voie phosphore ont été effectuées à un champ de 60 kHz. Le temps entre chaque scan était de 6 s en (a) et de 5 s en (b), soit environ 5 fois la valeur des constantes de temps de relaxation. Le nombre de scans en (a) était de 320 après 16 « dummy scans » et en (b) de 352 après 8 « dummy scans ». Les courbes sont des ajustements par une fonction mono-exponentielle des données expérimentales.

Bien qu'une détermination précise de la flexibilité des acides téichoïques n'ait pas été possible, les résultats exposés ici suggèrent qu'une des deux parties des acides téichoïques voit sa dynamique restreinte par le réseau formé par le peptidoglycane alors que la seconde fraction est située en dehors du peptidoglycane, vers l'extérieur de la cellule (Cf. Figure 2-8). Ces suppositions sont appuyées par des images obtenues par microscopie électronique à cryo-transmission de cellules bactériennes entières, qui laissent voir une zone duveuse à l'extérieur de la cellule, zone qui serait composée d'acides téichoïques et lipotéichoïques <sup>43</sup>.

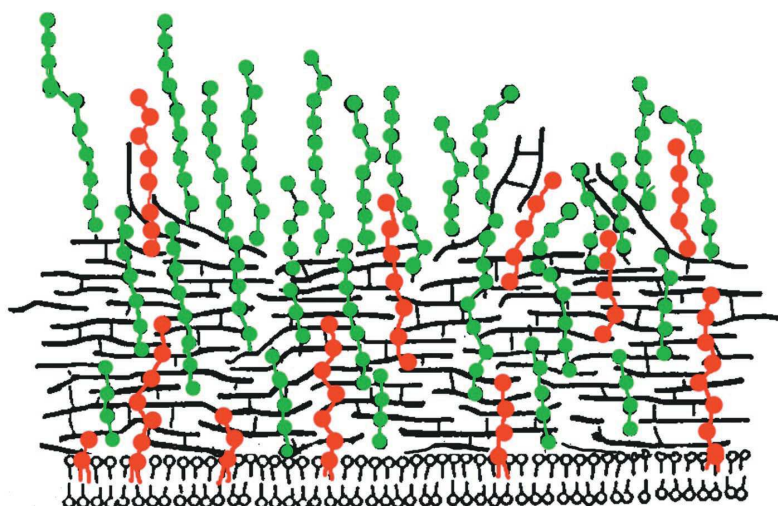


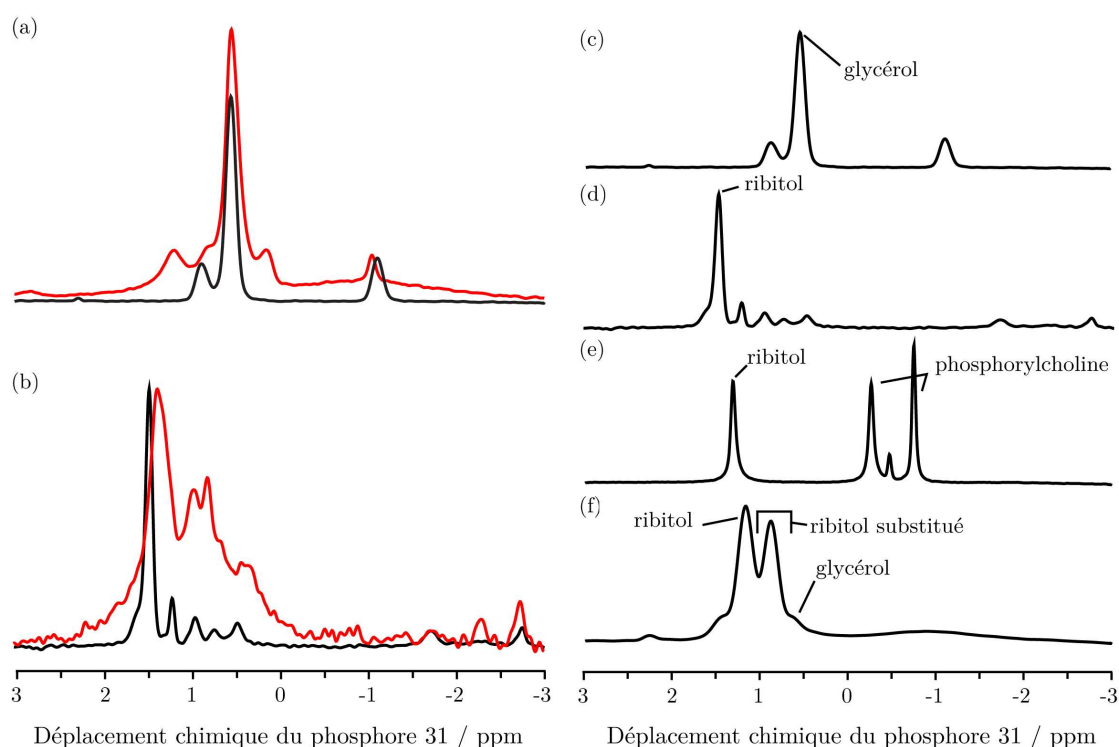
Figure 2-8. Représentation des acides téichoïques (en vert) au sein du peptidoglycane (en noir) et en dehors de la cellule. Les acides lipotéichoïques sont représentés en rouge. Les phospholipides de la membrane cytoplasmique sont représentés par les cercles noirs en bas de la figure. Figure extraite de la référence <sup>37</sup>.

### 2.1.2.3 Caractérisation par la RMN du phosphore

Afin de s'assurer que la structure chimique des acides téichoïques n'a pas été altérée lors de la préparation de l'échantillon de paroi cellulaire et d'attribuer les atomes de phosphore des acides téichoïques, des spectres 1D de résonance du phosphore ont été enregistrés à la fois sur les échantillons de paroi cellulaire mais aussi sur des échantillons de bactéries vivantes *B. subtilis* 168 et *B. subtilis* W23 (Cf. Figure 2-9). Ces spectres ont été obtenus par excitation directe, ce pour tous les échantillons de paroi cellulaire. En effet, les acides téichoïques sont trop mobiles pour donner lieu à du signal avec une bonne sensibilité quand une séquence de type CPMAS est utilisée. La RMN du phosphore est une technique de choix pour ce genre d'études car les déplacements chimiques du phosphore <sup>31</sup> sont très sensibles à l'environnement chimique dans lequel se trouve le noyau, et dans une moindre mesure au pH de l'échantillon et à la force ionique.

La lecture des spectres révèle que les résonances attribuées aux acides téichoïques dans les échantillons de paroi cellulaire peuvent être aussi observées dans les échantillons de bactéries entières, ce à des déplacements chimiques pratiquement identiques. Ce résultat montre tout d'abord que la structure chimique des acides téichoïques n'est pas modifiée pendant la préparation de l'échantillon et illustre le fait que les acides téichoïques peuvent être identifiés directement chez les bactéries vivantes, malgré la présence de résonances

supplémentaires provenant de l'ADN et/ou de la bicouche lipidique par exemple. Les acides téichoïques peuvent être donc directement étudiés par RMN en phase solide à la fois dans des échantillons de paroi cellulaire mais aussi dans des échantillons de bactéries entières. Ces études sont également envisageables grâce au fait que la viabilité des cellules n'est pas affectée par les conditions expérimentales liées à la RMN (rotation à l'angle magique, irradiations rf...). En effet, les bactéries entières sorties des rotors ont pu être cultivées après les expériences RMN sur des plaques agar.



**Figure 2-9.** Spectres de résonance du phosphore des bactéries à Gram positif vivantes et de la paroi cellulaire. A gauche : comparaison des spectres obtenus par excitation directe du phosphore sur les échantillons de cellules vivantes (en rouge) et sur les échantillons de paroi cellulaire isolée (en noir) de (a) *B. subtilis* 168 et de (b) *B. subtilis* W23. A droite : spectres obtenus par excitation directe du phosphore de la paroi cellulaire de (c) *B. subtilis* 168, (d) *B. subtilis* W23, (e) *S. pneumoniae* R6 et (f) *S. aureus*. L'attribution des différents spectres est donnée sur les figures. Les spectres ont été enregistrés comme indiqué sur la Figure 2-7 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Du découplage hétéronucléaire SPINAL<sup>127</sup> ou CW a été utilisé pendant l'acquisition, à un champ rf de 90 ou 45 kHz, respectivement. Le temps d'acquisition a pu varier de 50 à 120 ms, selon la force du champ rf de découplage. Le temps expérimental était de 1 h et le délai entre deux scans de 5 s.

La comparaison des spectres de résonance du phosphore obtenus sur les échantillons de paroi cellulaire de *B. subtilis* 168 et W23, *S. pneumoniae* et *S. aureus* permet de souligner le potentiel de la RMN en phase solide pour la caractérisation des acides téichoïques. En comparant les données précédemment publiées sur les acides lipotéichoïques de *S. pneumoniae* <sup>132</sup>, qui possèdent une structure chimique proche de celle des acides téichoïques de la même espèce, et notamment des groupes phosphate, les spectres des acides téichoïques ont pu être partiellement attribués. Les spectres enregistrés sur les quatre espèces étudiées partagent le fait que deux groupes de résonances peuvent être observés : les pics peu intenses correspondent aux phosphates participant à la liaison avec le peptidoglycane alors que les pics très intenses représentent les phosphates appartenant à la longue chaîne d'acides téichoïques. Dans le cas de *S. pneumoniae*, les pics intenses entre 0 et -1 ppm correspondent aux phosphorylcholines et le pic vers 1,3 ppm est attribué au ribitolphosphate. Cette dernière attribution est confirmée par l'observation du spectre de *B. subtilis* W23, chez qui la chaîne répétitive est constituée également de ribitolphosphate. Un pic intense y est constaté aux alentours de 1,4 ppm. Le glycérolphosphate est quant à lui attribué à plus bas champ, vers 0,6 ppm, en se basant sur le spectre de *B. subtilis* 168, chez qui le polymère de la chaîne principale est composé de glycérolphosphate. Les deux autres pics peu intenses présents sur ce spectre ont pu être attribués au phosphate lié au N-acétylmannose et à celui lié au N-acétylglucose permettant la liaison avec le peptidoglycane. Il a également été reporté dans la littérature que le déplacement chimique du glycérol substitué par l'alanine ou le glucose était déplacé de 0,2 à 0,7 ppm <sup>133</sup>. Un effet similaire portant sur les ribitolphosphates est supposé, ce qui pourrait expliquer les deux pics intenses à 1,2 ppm (le ribitol) et à 0,8 ppm (le ribitol substitué) observés sur le spectre de *S. aureus*. Enfin, les acides téichoïques de cette bactérie possèdent également du glycérolphosphate non-substitué, d'où l'observation d'un pic peu intense aux environs de 0,6 ppm.

Des fragments d'acides téichoïques et lipotéichoïques de bactéries variées ont abondamment été étudiés par RMN en phase liquide <sup>132-134</sup>. Les seules études effectuées par RMN en phase solide concernent des échantillons lyophilisés. Ces études traitent de la chélation de cations métalliques par les acides téichoïques <sup>114, 115</sup> et de l'adsorption sur différentes surfaces des acides lipotéichoïques <sup>104, 105</sup>. Notre étude montre que la RMN en phase solide du phosphore d'échantillons hydratés de paroi cellulaire ou de cellules vivantes à une vitesse modérée de rotation à l'angle magique (9-12 kHz) permet d'acquérir des spectres possédant une résolution similaire à celle d'un spectre obtenu par RMN en phase liquide. L'abondance naturelle de 100% du noyau de phosphore 31 (1,1% pour le carbone 13), ainsi que sa sensibilité (4,2 fois celle du carbone 13)

font de la RMN en phase solide du phosphore 31 un outil d'investigation de la paroi cellulaire des bactéries rapide et facile sans avoir besoin de recourir au marquage isotopique. L'étude comparative de quelques bactéries en Figure 2-9 montre que l'acquisition rapide d'un spectre de bactéries entières ou de paroi cellulaire permet d'identifier facilement la bactérie étudiée.

## 2.2 Mise en évidence des interactions entre les cations métalliques, les acides téichoïques et le peptidoglycane

La paroi cellulaire, et plus particulièrement les acides téichoïques, sont d'après la littérature impliqués dans les interactions avec les cations divalents <sup>112, 113, 133, 135</sup>. Différents modèles d'interactions entre ces cations et les acides téichoïques lyophilisés ont été suggérés <sup>114, 115</sup>. Dans la suite de ce chapitre, nous nous proposons d'étudier les interactions non pas avec les acides téichoïques seuls mais avec l'ensemble du peptidoglycane et des acides téichoïques hydratés formant la paroi cellulaire entière. Cette étude nous a amenés à proposer un nouveau modèle d'interactions prenant en compte les acides téichoïques mais aussi le peptidoglycane.

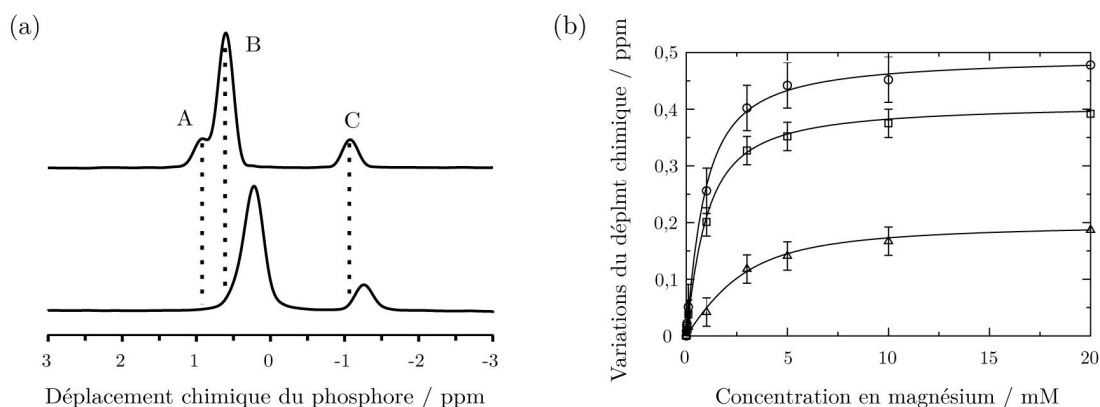
### 2.2.1 Préparation des échantillons

Dans le cadre de l'étude des interactions avec le magnésium, un échantillon de paroi cellulaire sans ion métallique de *B. subtilis* 168 a été séparé en 10 fractions équivalentes, qui ont chacune été centrifugées. Le palet a ensuite été resuspendu dans 1 ml de solution tampon HEPES à 50 mM et pH 7,5, contenant des concentrations variables en magnésium (0, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 3 mM, 5mM, 10 mM, 20mM) et 1% de HMPA afin de référencer le spectre. Les échantillons à 0 et 20 mM ont été utilisés pour les mesures de temps de relaxation.

Lors de l'étude des interactions de la paroi cellulaire avec les ions manganèse, ces ions étaient présents dans le milieu de culture ( $[\text{MnCl}_2]=0,1$  mM) et n'ont pas pu être éliminés malgré de multiples lavages. Seul le traitement de la paroi cellulaire par l'EDTA à 500 mM, qui forme des complexes avec les cations divalents, a permis d'éliminer le manganèse de la préparation d'acides téichoïques et de retrouver des raies fines.

### 2.2.2 Interactions avec le magnésium

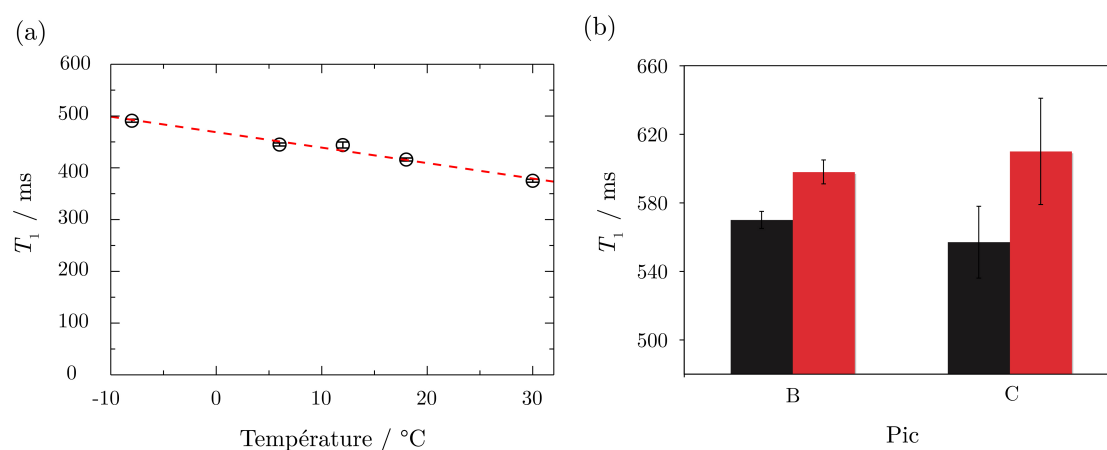
Les données recueillies par dialyse sur des acides lipotéichoïques extraits indiquent que leur affinité pour le magnésium et le calcium est plutôt faible ( $K_d \approx 15$  mM et  $\approx 9$  mM, respectivement) <sup>135</sup>. La même technique appliquée à la paroi cellulaire de *S. aureus* donne une constante de dissociation de l'ordre de 350  $\mu$ M pour les ions magnésium <sup>113</sup>. La possibilité d'une coordination bidentée entre les acides téichoïques et le magnésium a également été proposée suite à une étude par RMN en phase solide <sup>114, 115</sup> d'acides téichoïques lyophilisés. Cette même technique nous a permis d'étudier les interactions de la paroi cellulaire dans son ensemble (peptidoglycane et acides téichoïques intacts) avec les ions métalliques sur un échantillon hydraté.



**Figure 2-10.** Analyse quantitative de l'interaction des ions magnésium avec les groupes phosphate des acides téichoïques de *B. subtilis* 168. (a) Spectres 1D de résonance du phosphore des acides téichoïques en l'absence de magnésium (en haut) et en présence de 20 mM de MgCl<sub>2</sub> (en bas). (b) Variation des déplacements chimiques en fonction de la concentration en magnésium des pics A (cercle), B (carré) et C (triangle) indiqués sur le spectre (a). L'ajustement des courbes comme décrit précédemment <sup>136</sup> permet de déterminer les valeurs de  $K_d$  : ( $595 \pm 232$ )  $\mu$ M pour le pic A, ( $686 \pm 321$ )  $\mu$ M pour le pic B et ( $1242 \pm 730$ )  $\mu$ M pour le pic C. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Varian 14,1 T équipé d'une sonde 3,2 mm avec  $\omega_H/2\pi = 600$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 12$  kHz. La fenêtre spectrale était de 10 kHz. Le temps d'acquisition était réglé à 20 ms et le délai entre deux scans à 1 s. Le temps nécessaire à l'enregistrement d'un point de la courbe de titration était de 15 minutes. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire TPPM <sup>129</sup> a été appliqué, à un champ rf de 100 kHz. Le champ rf sur la voie phosphore a été calibré à 50 kHz.

La Figure 2-10 (a) compare les spectres 1D de résonance du phosphore enregistrés sur la paroi cellulaire de *B. subtilis* 168 en l'absence et en présence de magnésium. L'ajout des cations entraîne une variation des déplacements

chimiques de toutes les résonances des acides téichoïques. Comme cette variation s'est révélée être dépendante de la concentration en magnésium, une titration de la paroi cellulaire de *B. subtilis* par le magnésium a pu être effectuée. Le traitement des données a permis de déterminer une constante de dissociation pour les trois résonances des acides téichoïques :  $(595 \pm 232) \mu\text{M}$  pour le premier pic (A),  $(686 \pm 321) \mu\text{M}$  pour le second (B) et  $(1242 \pm 730) \mu\text{M}$  pour le troisième (C). Ceci montre que les ions magnésium interagissent environ 25 fois plus fortement avec la paroi cellulaire entière qu'avec les acides téichoïques isolés ( $K_d \approx 15 \text{ mM}$ )<sup>135</sup>, suggérant que l'arrangement architectural formé par les acides téichoïques au sein de la paroi cellulaire permet une interaction très efficace avec les cations et un bon approvisionnement de la membrane en ions positivement chargés.



**Figure 2-11.** (a) Dépendance à la température des constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  du phosphore mesurées sur la paroi cellulaire de *B. subtilis* 168. Les constantes de temps longitudinales ont été extraites pour la région comprise entre 1,5 et -2 ppm. La ligne rouge en pointillé suit la tendance qu'ont les constantes de temps de relaxation à diminuer en fonction de la température. (b) Constantes de temps de relaxation longitudinale  $T_1$  mesurées pour les résonances de phosphore B et C indiquées sur le spectre (a) de la Figure 2-10 par inversion-récupération en l'absence (en noir) et en présence de magnésium (en rouge). Tous les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences présentées en Figure 2-10 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Le temps entre deux scans était de 5 s, de façon à être au moins cinq fois supérieur aux constantes de temps mesurées.

L'effet des interactions avec les cations sur la flexibilité des acides téichoïques a également été étudié en mesurant les constantes de temps de relaxation longitudinale du phosphore en l'absence et en présence de magnésium (20 mM). Ces résultats, illustrés en Figure 2-11, n'ont pas pu donner la preuve formelle d'une modification de la flexibilité des acides téichoïques suite à une



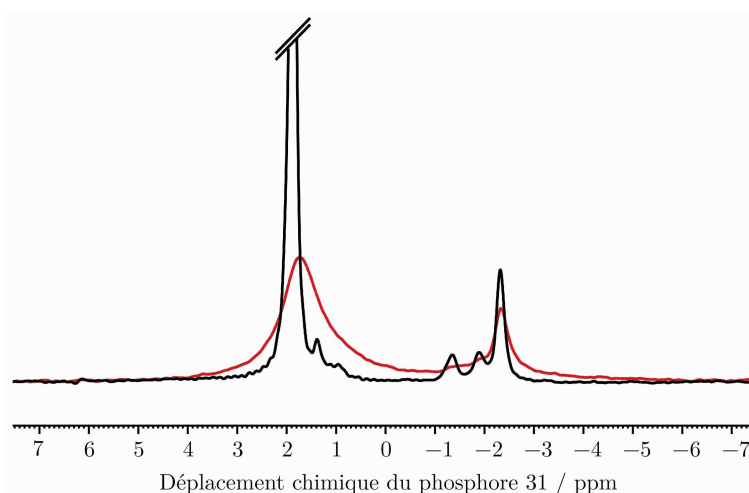
interaction avec le magnésium. Cependant, la différence observée entre les  $T_1$  mesurés en l'absence et en présence de magnésium, bien que très faible, est reproductible. Pour le pic le plus intense B, la différence entre les constantes de temps de relaxation est plus grande que l'erreur estimée. Dans le cas du pic le moins intense C, l'erreur estimée est plus grande que la différence entre les constantes de temps, mais la tendance qu'ont les  $T_1$  à augmenter en présence de magnésium pour toutes les résonances de l'échantillon de paroi cellulaire a pu être reproduite. Cette légère augmentation des constantes de temps de relaxation après ajout du magnésium pourrait indiquer une petite diminution de la flexibilité des acides téichoïques induite par l'interaction avec les ions magnésium.

### 2.2.3 Interactions avec le manganèse

Les interactions des acides téichoïques avec le manganèse ont également pu être étudiées car ce cation était présent dans le milieu de culture des bactéries. Le spectre 1D de résonance du phosphore enregistré sur la paroi cellulaire de *B. subtilis* 168 en présence de manganèse possède des raies beaucoup plus larges que le spectre de cette même paroi cellulaire traitée à l'EDTA (Cf. Figure 2-12). Cet élargissement des raies est le résultat d'interactions entre les cations paramagnétiques et les groupes phosphates des acides téichoïques. Au vu de l'importance de l'élargissement des raies de résonance du phosphore observé même à de très faibles concentrations en cations, nous pouvons supposer que la constante de dissociation du manganèse avec les acides téichoïques est aussi faible, voire plus faible que la constante de dissociation déterminée plus haut pour le magnésium. Cependant, il n'a pas été possible d'obtenir de plus amples informations sur la nature précise des interactions ainsi que d'identifier les sites spécifiques d'interactions, même si les groupes glycérolphosphates de la chaîne répétitive d'acides téichoïques semblent être les plus affectés.

Pour en apprendre davantage sur ces interactions, des expériences de corrélation carbone-carbone via le couplage scalaire ont été réalisées sur la bactérie *B. subtilis* 168. La Figure 2-13 montre l'impact de la présence d'ions manganèse résiduels sur ces spectres de corrélation. Sur les spectres enregistrés sur des échantillons contenant à la fois des acides téichoïques et du manganèse, les pics de corrélation entre les carboxyles/carbonyles et les carbones aliphatiques de l'acide glutamique et de l'acide *méso*-diaminopimélique sont élargis de façon significative et ne sont même plus visibles, ce à cause de l'interaction de ces résidus avec les cations paramagnétiques. Il est intéressant

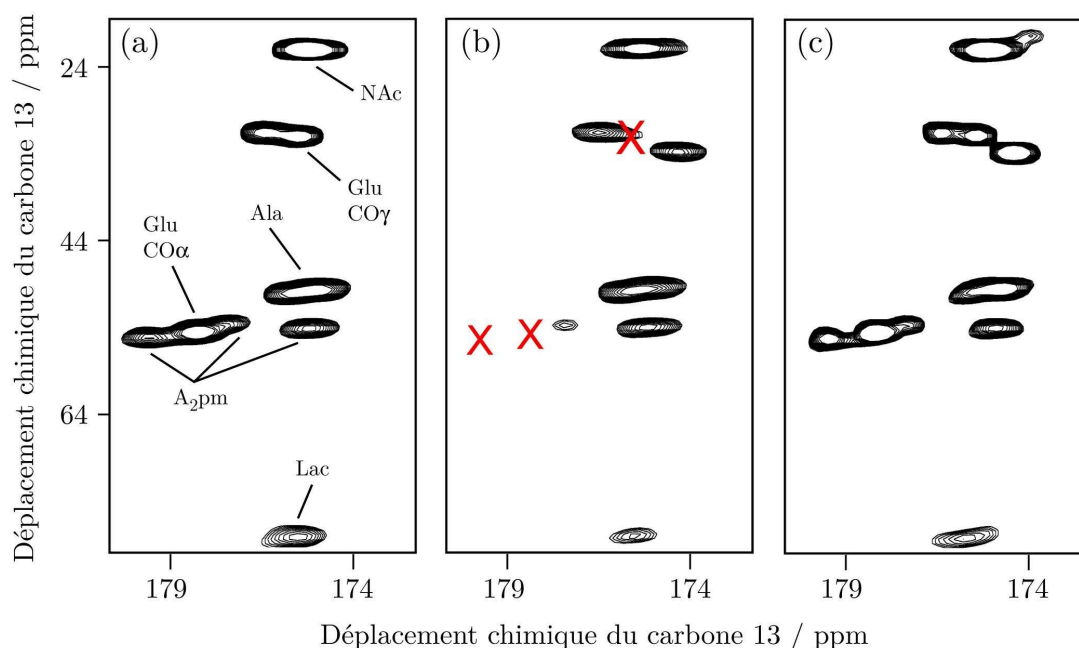
de remarquer que cette interaction n'a lieu qu'en présence des acides téichoïques et que les échantillons lavés à l'EDTA ne présentent pas de pics élargis.



**Figure 2-12.** Elargissement des raies de résonance du phosphore de la paroi cellulaire de *B. subtilis* W23 dû à la présence de manganèse dans le milieu de culture. En noir : spectre enregistré sur un échantillon lavé plusieurs fois avec de l'EDTA. En rouge : spectre enregistré sur un échantillon cultivé dans un milieu riche en manganèse. Les spectres ont été enregistrés par excitation directe dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences présentées en Figure 2-9 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Du découplage hétéronucléaire SPINAL<sup>127</sup> a été utilisé pendant l'acquisition. Le temps expérimental était de 40 minutes et le délai entre deux scans de 3 s. Une fenêtre d'apodisation de type exponentielle de 12 Hz a été appliquée aux deux spectres.

La présence d'ions manganèse dans les échantillons de paroi cellulaire a donc été détectée grâce à un élargissement de certaines raies sur les spectres de résonance du phosphore et du carbone. Comme expliqué précédemment, les pics de corrélation CO/C $\alpha$  des acides glutamiques et *méso*-diaminopiméliques ne sont plus visibles sur les spectres de corrélation carbone-carbone enregistrés sur des échantillons de paroi cellulaire de *B. subtilis* en présence de manganèse. Ce phénomène n'a lieu que si les acides téichoïques sont présents dans l'échantillon. Nous proposons donc une interaction intermoléculaire des ions manganèse avec à la fois les groupes carboxyles des acides glutamiques et *méso*-diaminopiméliques du peptidoglycane et les groupes phosphate des acides téichoïques (Cf. Figure 2-14). Le centre métallique du manganèse étant dans une géométrie octaédrique, les groupes carboxylates des acides glutamiques et *méso*-diaminopiméliques du peptidoglycane peuvent être deux ligands du manganèse. La sphère de coordination du cation peut être complétée par des interactions monodentées avec des groupes phosphate et des molécules d'eau ou par des interactions bidentées avec des groupes phosphate. Ces résul-

tats constituent la première preuve expérimentale que les acides téichoïques et le peptidoglycane coopèrent dans la géométrie et la thermodynamique des interactions avec les cations divalents. Ceci explique également pourquoi les constantes de dissociation du magnésium sont plus faibles dans les échantillons de paroi cellulaire que dans ceux d'acides téichoïques isolés.



**Figure 2-13.** Elargissement des raies du peptidoglycane et des acides téichoïques de *B. subtilis* 168 lors d'expériences de corrélation carbone-carbone via le couplage scalaire, enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales que les spectres présentés en Figure 2-2. Pics de corrélations entre les groupes carbonyles et les carbones aliphatiques observés sur des spectres 2D enregistrés sur des échantillons de peptidoglycane (a) sans acides téichoïques et sans EDTA, (b) avec acides téichoïques et sans EDTA et (c) avec acides téichoïques et EDTA.

L'amidation des groupes carboxyles empêche toute interaction avec les ions métalliques. Dans le cas de *B. subtilis*, l'amidation de l'acide *méso*-diaminopimélique dépend des conditions environnementales et peut représenter un mécanisme de régulation de la quantité d'ions liés à la paroi cellulaire<sup>37</sup>. Chez *S. aureus* où l'acide glutamique est toujours amidé, les interactions avec le magnésium pourraient être contrôlées par le taux de substitution par des alanines des acides téichoïques, comme discuté dans la littérature<sup>37, 113</sup>. Une corrélation inverse entre le taux d'alanylation et la concentration en magnésium a pu être déterminée pour différentes conditions de culture<sup>137, 138</sup>. L'interaction entre les cations, le peptidoglycane et les acides téichoïques que nous proposons pourrait être un mécanisme clé dans le stockage et

l'approvisionnement de la cellule en cations essentiels à sa croissance <sup>139</sup>. Les cations divalents sont connus pour être nécessaires à la multiplication et à la survie de certaines souches résistantes de *B. subtilis* <sup>139-141</sup>. Par exemple, l'un des mutants fonctionnels de cette bactérie ne possédant pas MreB, protéine du cytosquelette gouvernant l'élongation de la paroi cellulaire, n'a plus la forme d'un bâtonnet et n'est donc pas viable mais croît normalement dans un milieu enrichi en magnésium <sup>140</sup>. Ces mutants possédant des modes de synthèse ou des structures de paroi cellulaire affaiblis semblent avoir besoin de l'effet stabilisant des cations se liant à la fois au peptidoglycane et aux acides téichoïques. Il a aussi été supposé que le point isoélectrique de la paroi cellulaire détermine la sensibilité de la cellule aux molécules de défense cationiques de l'hôte, telles que les bactériocines et antibiotiques <sup>106</sup>. La paroi pourrait également jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire <sup>142</sup>. Enfin, il a été suggéré que dans le cas des bactéries à Gram positif, l'absence de membrane externe est compensée par la couche plus épaisse de peptidoglycane dont la porosité est réduite par les acides téichoïques <sup>38</sup>. Les interactions arbitrées par les cations entre le peptidoglycane et les acides téichoïques, comme décrites dans ce chapitre, pourrait représenter un aspect structural important de l'architecture de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif.

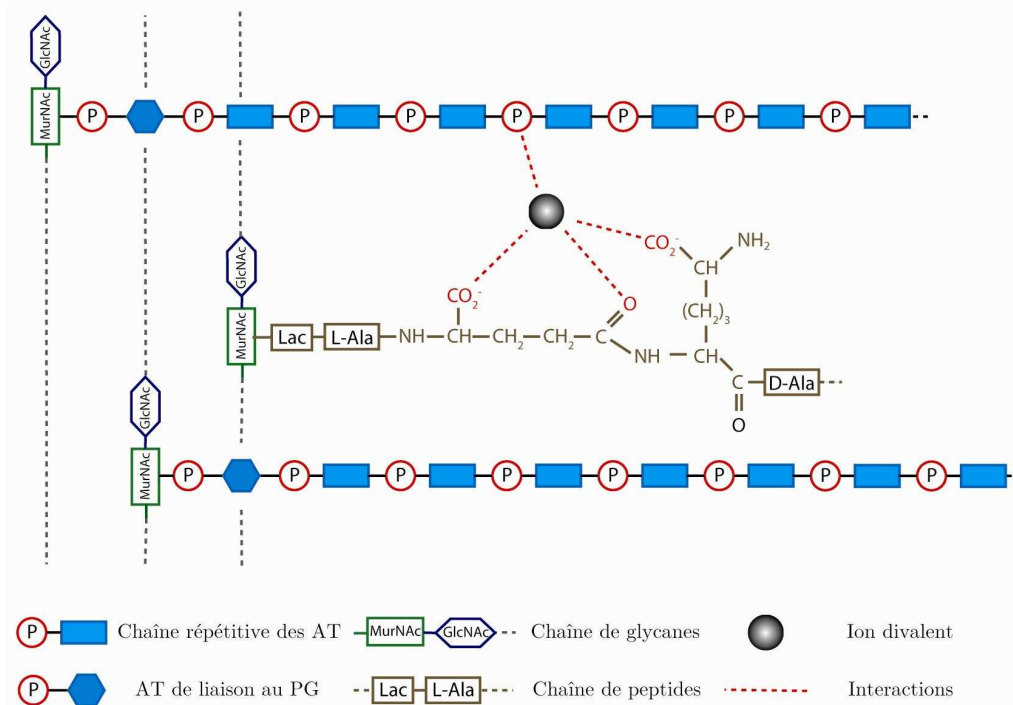


Figure 2-14. Représentation schématique des différents sites d'interactions possibles entre un ion métallique divalent et la paroi cellulaire de *B. subtilis*. Les lignes pointillées rouges représentent les interactions avec les ligands, qui peuvent être aussi bien monodentées que bidentées.

## 2.3 Conclusion

Malgré de nombreuses années de recherche, l'acquisition d'informations portant sur la paroi cellulaire bactérienne reste très difficile, due d'une part à l'énorme taille du système étudié et d'autre part à la complexité des biomolécules qui le composent. Lors de ce projet, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des spectres très bien résolus en utilisant la RMN en phase solide du carbone et du phosphore sur des échantillons hydratés de différentes espèces bactériennes. Les données obtenues sur la paroi cellulaire mais aussi sur les cellules intactes de bactéries à Gram positif permettent d'augmenter nos connaissances sur l'arrangement moléculaire et la flexibilité de deux des constituants principaux de la paroi bactérienne.

La comparaison des spectres de corrélation carbone-carbone et les expériences de relaxation ont montré que, malgré une organisation locale similaire, la flexibilité du peptidoglycane de *E. coli* est plus importante que celle de *B. subtilis*, qui est elle-même plus grande que celle de *S. aureus*. Cette modification de la flexibilité est gouvernée par le degré de réticulation du peptidoglycane, paramètre qui compense pour les autres éléments structuraux comme la longueur des chaînes de glycanes ou la présence et la nature d'un pont inter-peptidique.

La RMN en phase solide du phosphore apparaît quant à elle comme une technique puissante pour l'étude des acides téichoïques contenus dans des échantillons de paroi cellulaire isolée mais aussi dans des échantillons de cellules vivantes, et ce sans avoir besoin de marquage isotopique. Des modifications de la structure chimique de ces éléments sont rapidement détectées. Cette méthode est également très sensible à la présence d'ions métalliques divalents et nous a permis de déterminer des constantes de dissociation. En complément de la RMN du carbone, cette technique a donné lieu à la détermination de sites d'interactions avec les métaux. La combinaison de ces deux techniques spectroscopiques a également permis de mettre en évidence le fait que les ions divalents sont stabilisés à l'intérieur de la paroi cellulaire à la fois par le peptidoglycane mais aussi par les acides téichoïques et de proposer une nouvelle géométrie de coordination des cations divalents à l'intérieur de la paroi.

Les expériences de relaxation et de corrélation carbone-carbone pourraient être appliquées dans le futur à des échantillons de bactéries résistantes aux antibiotiques afin d'étudier leur effet sur la structure et dynamique des bactéries ayant subies une mutation. Il est également envisagé d'étudier les interactions entre les antibiotiques et les constituants de la paroi cellulaire. La RMN du phosphore pourrait quant à elle être très utile à l'identification et la

typification des différentes espèces bactériennes. Cette méthode ayant fait ses preuves sur des échantillons de bactéries vivantes, les mécanismes de morphogénèse et de développement de la paroi cellulaire pourraient être étudiés *in vivo*. L'absence de structure tridimensionnelle du peptidoglycane constituant une réelle barrière à une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance du peptidoglycane et des réactions catalytiques contrôlées par les protéines interagissant avec ce polymère, la détermination structurale du peptidoglycane par RMN en phase solide est également l'un des objectifs du laboratoire. Comme expliqué dans le chapitre 1, les principales questions en suspens sont l'orientation des chaînes de glycanes par rapport à la surface de la cellule, mais aussi les mécanismes d'insertion de nouveaux fragments de peptidoglycane au sein du réseau existant. Enfin, plus généralement, la RMN en phase solide pourrait être appliquée à toute surface cellulaire. L'étude de cellules eucaryotes est envisageable, et plus particulièrement celle de cellules épithéliales, principales cibles des agents infectieux. De ces études pourraient être tirées des informations sur la colonisation des bactéries ainsi que sur la formation des biofilms.

Nous avons souhaité étudier les interactions entre les acides téichoïques de la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* avec l'une de ses protéines de surface impliquée dans la virulence bactérienne. Ceci fait l'objet du chapitre suivant.



## Chapitre 3

---

Etude des interactions entre les acides téichoïques de *Streptococcus pneumoniae* et la phosphorylcholine estérase CBPE





### 3. Etude des interactions entre les acides téichoïques de *Streptococcus pneumoniae* et la phosphorylcholine estérase CBPE

*Streptococcus pneumoniae* est l'une des causes majeures de mortalité infantile dans le monde, principalement dans les pays en voie de développement. Chaque année, 14,5 millions de personnes sont sujets à une infection bactérienne causée par *S. pneumoniae*, parmi lesquelles 10,6 millions sont des enfants de moins de cinq ans. Les autres patients principalement touchés par cette bactérie sont les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. Plus de 66% des malades sont originaires de moins de 10 pays, situés en Asie et en Afrique (Cf. Figure 3-1). *S. pneumoniae* peut être la cause de pneumonies, méningites, septicémies ou encore d'otites. Chaque année, la pneumonie à elle seule fait 5 millions de victimes parmi les enfants de moins de cinq ans dans le monde, dont 1 million de cas sont dus à *S. pneumoniae* <sup>143-145</sup>. Les traitements actuels sont rendus de plus en plus inefficaces par le nombre croissant de souches bactériennes résistantes aux antibiothérapies <sup>146-148</sup>. Les vaccins posent également problème <sup>143, 144, 149, 150</sup>. La stratégie actuelle est d'utiliser les propriétés immunogènes des polysaccharides constituant la capsule de la bactérie. La composition chimique de cette capsule sert également de base à la classification des bactéries en catégories appelées sérotypes. Il existe chez *S. pneumoniae* pas moins de 90 sérotypes. Hors, les vaccins actuels ne sont efficaces que contre des sérotypes homologues ! Le vaccin le plus efficace utilisé actuellement contient la capsule de 23 sérotypes différents, qui sont la cause de 90 % des cas graves. Cependant, et ce pour des raisons inconnues, ce vaccin est peu efficace chez les enfants de moins de deux ans <sup>143, 144</sup>. Il existe donc un besoin urgent de nouveaux antibiotiques et de nouveaux vaccins afin de pouvoir lutter plus efficacement contre *S. pneumoniae*. Afin de mettre au point un nouveau vaccin couvrant plus de sérotypes, il serait intéressant d'utiliser les protéines se situant à la surface de la bactérie et entrant en jeu dans les interactions avec l'hôte que la bactérie cherche à coloniser. Le principal avantage de cette méthode est que ces protéines sont homologues parmi les 90 sérotypes de *S. pneumoniae*. Cette approche pourrait permettre de mettre au point un vaccin universel <sup>151</sup>. Cependant, la mise au point de ce vaccin passe d'abord par une meilleure compréhension du mode de fonctionnement de ces protéines de surface et de leurs interactions à la fois avec la bactérie mais aussi avec leur hôte. Dans notre étude, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à l'une de ces protéines de surface : la phosphorylcholine es-

térase E ou CBPE, et à la façon dont elle interagit avec les acides téichoïques de *S. pneumoniae*. Nous consacrerons donc la première partie de ce chapitre à la description de la structure de CBPE et de son implication dans la virulence du pneumocoque. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à notre étude par RMN en phase solide des interactions acides téichoïques-CBPE.

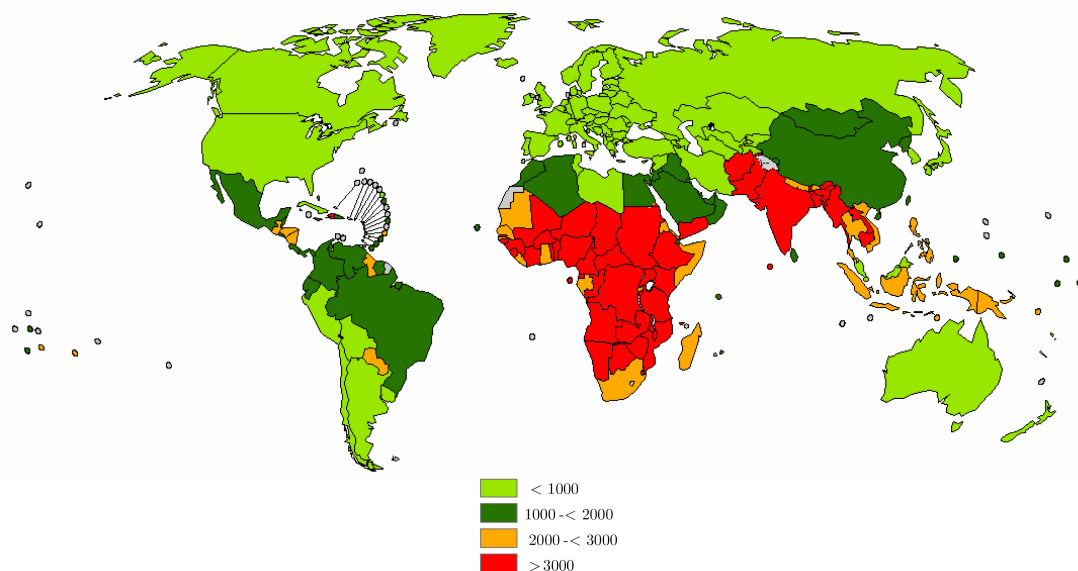


Figure 3-1. Taux d'incidence de *Streptococcus pneumoniae* pour l'année 2000 pour 100 000 enfants de moins de cinq ans. Illustration tirée du site web de l'Organisation Mondiale de la Santé <sup>143</sup>.

### 3.1 La phosphorylcholine estérase CBPE

La plupart des interactions entre la bactérie et son hôte ont lieu via les composants de la paroi cellulaire bactérienne, et plus spécifiquement avec les acides téichoïques et lipotéichoïques (Cf. Chapitre 1 où est donné un descriptif de leur structure et fonctions). Par exemple, l'une des multiples fonctions de la phosphorylcholine de ces acides est de servir de lieu d'ancrage des protéines de surface liant la choline de *S. pneumoniae* (ou « Choline Binding Proteins », CBP). Jusqu'à maintenant, quinze CBPs ont été identifiées chez les souches de pneumocoques (CBPA-G et LytA-C) <sup>40, 41</sup>, chacune possédant un domaine liant la choline (ou « Choline Binding Domain », CBD) <sup>152</sup>. La phosphorylcholine estérase CBPE est une protéine de plus de 69 kDa <sup>153</sup>. Son domaine catalytique est localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine (312 acides aminés), permettant à l'enzyme d'hydrolyser la liaison phosphoester reliant le groupe phosphorylcholine aux acides téichoïques en libérant une molécule de

phosphorylcholine. Le domaine liant la choline est relié au domaine catalytique par un lien court de 12 résidus. Il est situé à l'extrémité C-terminale et est composé de 10 unités d'environ 20 acides aminés se répétant (205 acides aminés au total). Enfin, CBPE possède une queue C-terminale de 85 résidus.

### 3.1.1 *Domaine catalytique et hydrolyse de la phosphorylcholine*

L'activité enzymatique de CBPE a été décrite pour la première fois en 1974<sup>154</sup>. Les auteurs ont pu mettre en évidence le fait que la protéine est capable d'enlever entre 15 et 20 % des résidus phosphorylcholine de la paroi cellulaire d'un pneumocoque. Ils ont également pu montrer que le produit de la réaction enzymatique est la phosphorylcholine. En 2001, Vollmer et Tomasz ont pu identifier le gène *pce* codant pour CBPE, surexprimer et purifier la protéine et tester son activité enzymatique in vitro<sup>153</sup>. Les auteurs ont confirmé l'observation de Høltje et Tomasz<sup>154</sup>. L'hydrolyse des phosphorylcholines des acides téichoïques par CBPE est incomplète et est limitée à 30% de la phosphorylcholine totale contenue dans la paroi cellulaire du pneumocoque.

La structure cristalline du domaine catalytique de CBPE a été résolue en 2005 par deux équipes différentes par diffractométrie de rayons X<sup>155-157</sup>. Les deux études concordent et ont permis de mettre en évidence que le module catalytique forme un domaine globulaire de  $55 \times 53 \times 45$  Å (Cf. Figure 3-2). Le module catalytique se replie de façon à former un sandwich  $\alpha\beta$ - $\beta\alpha$ . Ce domaine peut être divisé en deux régions presque équivalentes dont la composition varie légèrement selon les auteurs. Par exemple, Hermoso *et al.* considèrent que chaque région est constituée d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle et de trois motifs  $\alpha\beta$ <sup>156</sup>. Le site actif se situe à l'interface des deux feuillets  $\beta$  de chaque région et forme une cavité profonde de 12 Å contenant deux ions métalliques, fer ou zinc, selon la structure cristalline obtenues. Garau *et al.* notent également la présence d'une boucle allongée se situant au-dessus du site actif et permettant de délimiter la poche catalytique<sup>155</sup>. L'orientation de cette boucle pourrait moduler la forme et/ou l'accessibilité du site actif par le substrat qu'est la chaîne d'acides téichoïques. Deux cations  $\text{Ca}^{2+}$  permettraient de stabiliser cette boucle. Hermoso *et al.* ont pu obtenir la structure cristalline de CBPE en interaction avec la phosphorylcholine et ont montré que les ions métalliques étaient impliqués dans les interactions et le positionnement du substrat en coordonnant directement le phosphate<sup>156</sup>. Ce groupe est également reconnu par une histidine du site actif et deux molécules d'eau via des interactions polaires, pendant que le groupe triméthylammonium est stabilisé par des interactions cations- $\pi$ .

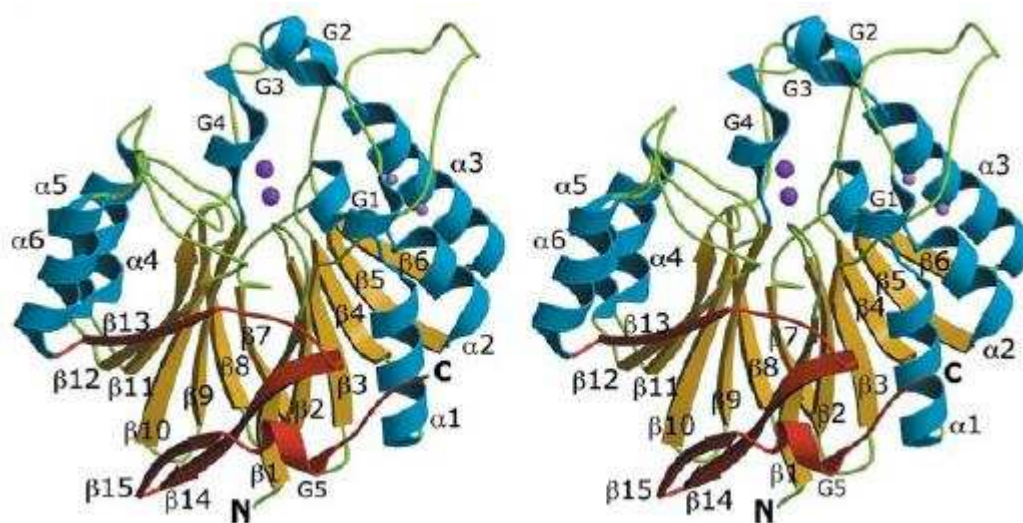
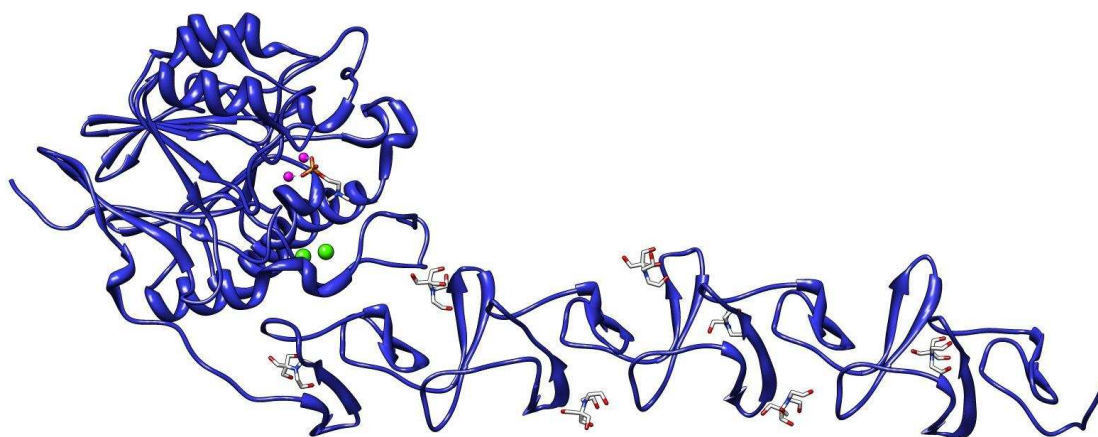


Figure 3-2. Structure du domaine catalytique de CBPE. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Les hélices sont dessinées en bleu, les brins  $\beta$  en jaune et les boucles en vert. Les ions calcium et fer sont représentés par des sphères violettes et grises, respectivement. Le domaine connectant la région catalytique au domaine liant la choline est représenté en rouge. La figure est tirée de Garau *et al.* <sup>155</sup>.

### 3.1.2 Domaine liant la choline et interactions avec les acides téichoïques

Seuls Hermoso *et al.* ont pu cristalliser la protéine CBPE dans son ensemble <sup>156</sup>. Leur étude réalisée par diffractométrie de rayons X montre que le domaine liant la choline de CBPE est formé par dix répétitions d'un même motif possédant la séquence consensus  $\text{GWX}_6\text{WYYX}_4\text{GXXMX}_2$ . Chaque répétition forme une boucle en épingle à cheveux  $\beta$  symétrique. Le module liant la choline prend approximativement la forme d'un prisme triangulaire de 110 Å de hauteur et de 26 Å de côté (Cf. Figure 3-3). Les sites d'interactions avec la choline sont placés le long des trois faces latérales du prisme. Les dix répétitions forment une superhélice de pas gauche. Les boucles en épingles à cheveux s'étendent perpendiculairement à l'axe de la superhélice, chaque répétition étant située à 120° de la précédente. Les sites d'interactions avec la choline sont localisés à l'interface de deux répétitions successives, où trois résidus aromatiques (deux tryptophanes de la première répétition et une tyrosine de la suivante) forment une cavité dans laquelle le groupe triméthylammonium de la choline est stabilisé par des interactions cations- $\pi$ . Les données recueillies par Hermoso *et al.* suggèrent la présence de dix sites d'interactions avec la choline dans l'ensemble de CBPE.



**Figure 3-3.** Structure de CBPE en interaction avec la phosphorylcholine et des analogues de la choline. La phosphorylcholine se situe dans le site actif. Les analogues de la choline sont liés aux sites liant la choline du CBD alors que les ions zinc sont représentés par des sphères violettes et les ions calcium par des sphères vertes <sup>158</sup>.

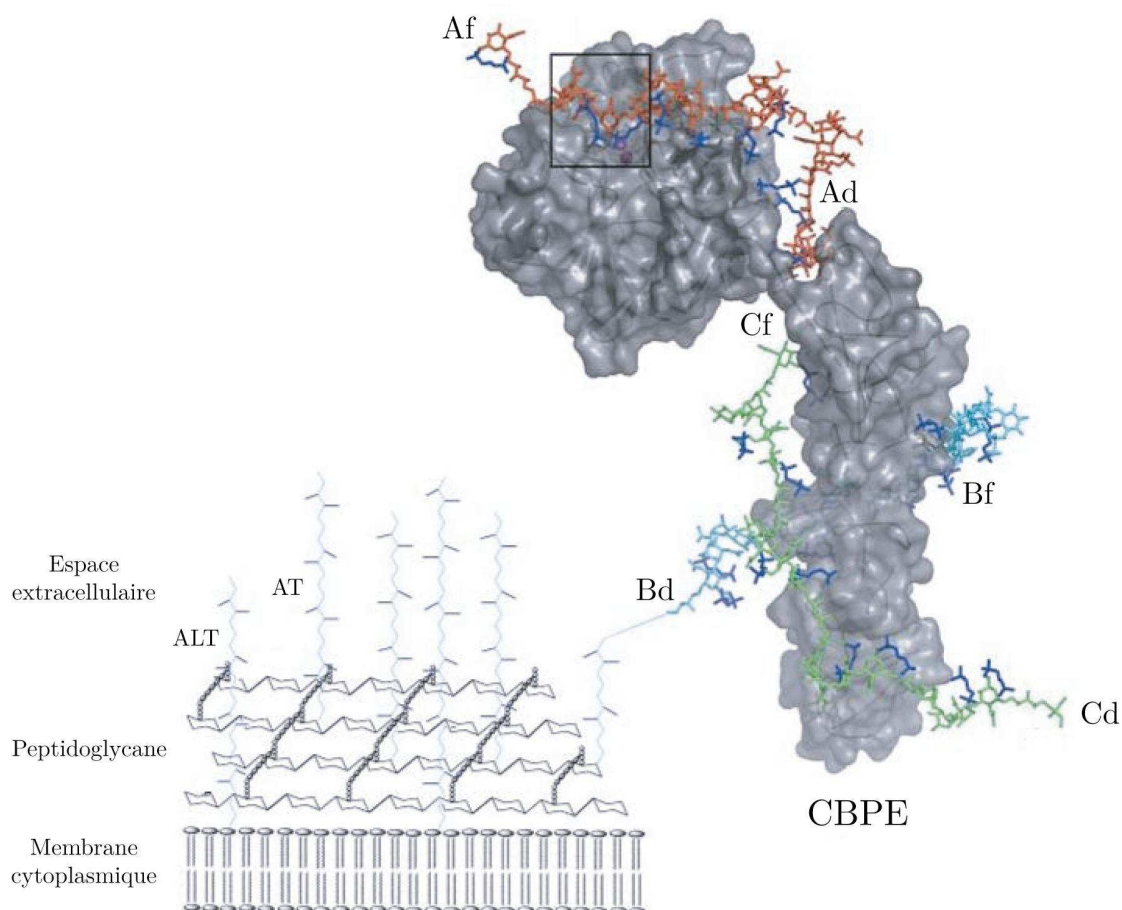
Les interactions entre CBPE et les acides téichoïques de la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* ont été modélisées par Hermoso *et al.* et Garau *et al.* Ces derniers proposent qu'une chaîne d'acides téichoïques (la chaîne A) s'insère dans la cavité catalytique de CBPE <sup>155</sup> (Cf. Figure 3-4). La phosphorylcholine la plus accessible pour l'hydrolyse serait celle reliée à la N-acétyl-D-galactosamine, elle-même reliée au ribitol phosphate. Ceci suggère que CBPE ne peut pas hydrolyser toutes les phosphorylcholines à cause de contraintes structurales. L'interaction de deux autres chaînes d'acides téichoïques (les chaînes B et C) peut être modélisée le long du domaine liant la choline.

### 3.1.3 Implications de CBPE dans la virulence de *S. pneumoniae*

CBPE serait impliquée dans l'adhésion et la colonisation des cellules hôtes. En effet, Gosink *et al.* ont constaté que les souches mutantes de *S. pneumoniae* ne possédant pas le gène codant pour CBPE ont une capacité moindre à coloniser le nasopharynx chez le rat et à adhérer aux cellules humaines <sup>159</sup>.

La prolifération de l'infection après adhésion aux cellules hôtes nécessite la pénétration de la matrice extracellulaire par la bactérie par dégradation protéolytique. Pour ce faire, la bactérie va alors recruter des protéases de l'hôte, dont la plasmine. Attali *et al.* ont montré que CBPE interagit avec la

proenzyme plasminogène à la surface de *S. pneumoniae* et que cette proenzyme est capable, après activation, de produire la plasmine <sup>160</sup>. Ceci pourrait faciliter la migration des bactéries à travers les tissus tels que l'épithélium et l'endothélium via la dégradation de la matrice extracellulaire.



**Figure 3-4.** Modèle d'interactions entre les acides téichoïques et CBPE. La surface de la protéine CBPE est en gris. Trois chaînes d'acides téichoïques A, B et C ont été modélisées. Le début et la fin de chaque chaîne sont indiqués par les lettres d et f, respectivement. Les chaînes sont colorées en rouge (A), bleu (B) et vert (C) et les groupes phosphorylcholine en bleu foncé. La liaison entre la chaîne B et la N-acétyl-D-glucosamine du peptidoglycane est représentée schématiquement, ainsi que l'orientation des acides téichoïques (AT) et lipotéichoïques (ALT) au sein de la paroi cellulaire. Illustration tirée de Garau *et al.* <sup>155</sup>.

Enfin, Vollmer *et al.* ont constaté que l'inactivation du gène *pce* chez *S. pneumoniae* cause des changements dans la morphologie de la colonie bactérienne et une augmentation de la virulence dans la cavité péritonéale de la souris <sup>153</sup>. Même si ces résultats semblent contredire ceux de Gosink *et al.*, ils

illustrent le fait que CBPE pourrait être un élément régulateur des interactions entre la bactérie et son hôte.

## 3.2 Etude par RMN en phase solide des interactions entre la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et CBPE

### 3.2.1 Un projet très ambitieux

Comme décrit plus haut, à l'heure actuelle, les interactions entre les acides téichoïques et CBPE n'ont pu être approchées que par simulation. Ces interactions ont pu être modélisées soit par comparaison avec des données existantes portant sur d'autres CBD<sup>155</sup> soit en considérant la structure cristalline de CBPE en présence de petites molécules analogues au groupement phosphorylcholine porté par les acides téichoïques<sup>156</sup>. De nombreuses questions sont encore en suspens : l'une des deux phosphorylcholines portées par l'unité monomérique des acides téichoïques est-elle préférentiellement impliquée dans ces interactions comme suggéré par Garau *et al.* ? Ceci pourrait-il expliquer la faible proportion de phosphorylcholines hydrolysées ? Quels sont les acides aminés et plus précisément les atomes de ces éléments de CBPE qui sont impliqués dans ces interactions ? Ce projet, bien que n'ayant pas abouti jusqu'à présent, a pour but de répondre à ces questions via la détection et l'identification formelle des interactions entre les atomes de phosphore des acides téichoïques et les atomes de carbone de CBPE.

La technique choisie afin de détecter ces interactions est la RMN en phase solide. Ce choix a été motivé par le fait que cette méthode nous permet de réaliser nos expériences sur la paroi cellulaire intacte de *S. pneumoniae* et l'ensemble du domaine liant la choline de CBPE. Il a ensuite été question du choix de la méthode de recouplage hétéronucléaire entre les carbones et les phosphores à utiliser. Les interactions n'étant pas de nature covalente, le choix devait nécessairement se porter sur une séquence de recouplage faisant intervenir le couplage dipolaire  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ , à travers l'espace. L'analyse de la structure cristalline de CBPE en interaction avec un analogue de la phosphorylcholine résolue par Hermoso *et al.* nous a permis d'estimer les distances entre les atomes de phosphore des acides téichoïques et les atomes de carbone de CBPE à une valeur comprise entre 4 et 6 Å. Il nous a donc fallu choisir une méthode de recouplage permettant le transfert d'aimantation à longue distance entre les carbones et les phosphores. Ces derniers étant uniquement présents dans les acides téichoïques et donc nécessairement à longue distance des



carbones de la protéine, les couplages dipolaires hétéronucléaires que nous voulions détecter étaient les plus importants parmi ceux présents dans le système. Il n'y a donc pas dans ce cas de problème de troncature dipolaire (Cf. chapitre 6). Les techniques de recouplage à notre disposition étaient les suivantes : double polarisation croisée (DCP)<sup>161-164</sup>, REDOR<sup>165-169</sup>, CHHP (sur le modèle de NHHC<sup>170</sup>) et PAIN-CP<sup>33, 34</sup>, accompagnées de leurs différentes variantes. Certaines de ces méthodes ont récemment fait leurs preuves dans la détection de contacts intermoléculaires à longue distance<sup>171, 172</sup>. Par exemple, la séquence PAIN-CP a permis de mettre en lumière des contacts intermonomériques chez la protéine Crh<sup>33</sup>. La séquence TEDOR a quant à elle été plus particulièrement impliquée (entre autre) dans un transfert à longue distance faisant intervenir des atomes de phosphore : des expériences de corrélation <sup>31</sup>P-<sup>15</sup>N ont révélé des interactions intermoléculaires au sein d'un complexe protéine/ARN<sup>173</sup>. De part la nature des mécanismes entrant en jeu dans les séquences DCP et TEDOR, nous avons supposé que les temps de mélange nécessaires à un transfert à longue distance seraient très longs (plusieurs dizaines de millisecondes), ce qui peut être préjudiciable pour l'échantillon. La séquence CHHP souffre pour sa part d'une faible sensibilité (le lecteur est invité à consulter le chapitre 6 pour plus de détails sur ces séquences). Ces inconvénients sont moins présents dans la séquence PAIN-CP. De plus, comme une partie de cette thèse porte sur l'amélioration de l'efficacité de cette séquence (Cf. chapitre 7), nous avons donc choisi de recourir à cette technique optimisée, PAIN-CP- $\pi$ -shift, lors de notre étude.

Malgré le fait qu'un transfert de polarisation à longue distance est envisageable grâce à la séquence PAIN-CP, cette expérience reste très ambitieuse, notamment pour trois raisons. Tout d'abord, la distance entre les carbones de la protéine et les phosphores des acides téichoïques a seulement été estimée à partir de la structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie de rayons X de la protéine en interactions avec un analogue azote et non phosphore de la phosphorylcholine. Selon ces estimations, cette distance est très importante et se situe à la limite de ce qui est détectable avec les techniques de recouplage actuelles (autour de 5 Å). De plus, notre estimation pouvant être fausse, cette distance interatomique pourrait être plus importante et donc indétectable. Ensuite, nous savons que les acides téichoïques sont très mobiles en l'absence de protéine (Cf. Chapitre 2), qu'en est-il lors de leur interaction avec CBPE ? Si la mobilité des acides téichoïques n'est pas suffisamment réduite lors des interactions, un transfert de polarisation via des couplages dipolaires serait impossible. Finalement, la part des acides téichoïques qui est hydrolysée par la protéine est seulement de 15 à 30 pourcent<sup>153, 154</sup>. Ceci implique-t-il qu'une très faible proportion d'acides téichoïques est liée à la protéine ?

### 3.2.2 Simulations

Avant de commencer les expériences, et malgré les multiples inconnues recensées dans le paragraphe précédent, les transferts d'aimantation PAIN-CP, PAIN-CP avec  $\pi$ -shift et DCP entre les atomes de carbone de la protéine et les atomes de phosphore portés par les acides téichoïques ont pu être simulés grâce au logiciel Spinevolution<sup>174</sup>. En règle générale, les simulations de telles séquences nous indiquent si les expériences envisagées sont réalisables et, si c'est le cas, nous permettent de cerner les conditions expérimentales optimales.

#### 3.2.2.1 Système de spins utilisé et conditions de simulation

Le système de spins utilisé lors des simulations est composé d'un atome de carbone aromatique et de trois atomes d'hydrogène appartenant au résidu tryptophane 425 de CBPE ainsi que d'un atome de phosphore distant de 4,5 ou 6 Å, selon les simulations (Cf. Figure 3-5 (a)). Il a été choisi d'utiliser des atomes extraits du résidu tryptophane 425 car celui-ci fait partie d'un site d'interaction du CBD de CBPE avec la phosphorylcholine. Il a été plus précisément choisi de considérer un atome de carbone aromatique puisque les interactions régissant les contacts CBPE-acides téichoïques sont du type cations- $\pi$ . Enfin, comme signalé plus haut, l'analyse de la structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie<sup>156</sup> nous a permis d'estimer la distance entre les carbones de la protéine et les phosphores des acides téichoïques à une valeur comprise entre 4 et 6 Å.

Les transferts de polarisation ont été simulés dans le cas d'un spectromètre 500 MHz et pour une vitesse de rotation à l'angle magique de 11 kHz. Les déplacements chimiques isotropes de tous les atomes ont été fixés à zéro (irradiations en résonance). Les paramètres d'anisotropie de déplacement chimique du carbone correspondent aux valeurs typiques trouvées dans la littérature<sup>175</sup>. La valeur du CSA de l'atome de phosphore, non connue expérimentalement au moment où les simulations ont été réalisées, varie en fonction de la simulation : les valeurs suivantes ont été utilisées : 10, 25, 50 et 100 ppm. Enfin, les temps de mélange choisis lors de la simulation des cartes de transfert sont de 10 ms dans le cas de l'expérience PAIN-CP avec ou sans  $\pi$ -shift et de 10 et 20 ms dans le cas de l'expérience DCP.

### 3.2.2.2 Simulations de transferts PAIN-CP

Des cartes de transfert de polarisation PAIN-CP et PAIN-CP avec  $\pi$ -shift (Cf. Figure 3-5 (b)-(d)) ont pu être simulées et représentées en fonction de la puissance de champs rf sur les voies proton  $p_H$ , carbone  $p_C$  et phosphore  $p_P$ , exprimées en fonction de la vitesse de rotation, dans le cas où  $p_C=p_P$ . Comme expliqué en détails dans le chapitre 7 et visualisé sur ces simulations, l'introduction d'un changement de phase de  $\pi$  dans les expériences PAIN-CP améliore l'efficacité du transfert. Dans la suite de cette étude, nous ne considérerons donc que le cas des transferts PAIN-CP avec  $\pi$ -shift. Des simulations ont été réalisées pour des distances carbone-phosphore de 4,5 ou 6 Å. Dans le premier cas, la lecture des cartes de transfert révèle une zone où le recouplage TSAR est particulièrement efficace. Dans le deuxième, le transfert est presque totalement absent. Nous n'avons donc pas représenté ces cartes.

L'efficacité de transfert  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  PAIN-CP avec  $\pi$ -shift en fonction du temps de mélange a également été simulée et représentée, dans le cas où l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore est égale à 10 ppm (Cf. Figure 3-5 (e)). La puissance des champs rf a été choisie comme suit :  $p_C=p_P=4,4$  et  $p_H=4$  et correspond à une condition où d'après la carte de transfert représentée en Figure 3-5 (b), le transfert PAIN-CP avec  $\pi$ -shift est le plus efficace, considérant les puissances accessibles sur des sondes de 4mm de diamètre. L'efficacité de transfert semble être à son maximum pour un temps de mélange de 18 ms environ. Il est important de noter que cette simulation ne prend pas en compte l'effet de la relaxation. En considérant la relaxation qualitativement, le maximum de la courbe d'efficacité de transfert devrait se situer à un temps de mélange plus court, que nous estimons entre 8 et 13 ms. Le fait d'avoir simulé les cartes de transfert pour un temps de mélange de 10 ms nous semble donc être un choix raisonnable.

L'effet de l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore sur l'efficacité du transfert PAIN-CP avec  $\pi$ -shift peut être visualisé sur la Figure 3-5 (b)-(d). Comme mentionné plus haut, nous avons simulé les cas où la valeur du CSA était égale à 10 (b), 25 (non-représenté), 50 (c) et 100 ppm (d). Selon les simulations, l'optimum de transfert semble être atteint pour une valeur de CSA proche de 50 ppm.

Ceci peut être expliqué par la théorie du mécanisme TSAR <sup>32-34</sup>. Dans les chapitres 6 et 7, nous en donnons un bref résumé, suffisant pour comprendre l'effet du changement de phase de 180 degrés au milieu de l'irradiation CW intervenant lors des séquences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift. Nous ne nous répéterons donc pas dans ce paragraphe, mais allons seulement fournir

les équations nécessaires à la compréhension du phénomène décrit plus haut et mis en valeur par les simulations. Le lecteur est invité à consulter les chapitres 6 et 7 pour de plus amples détails.

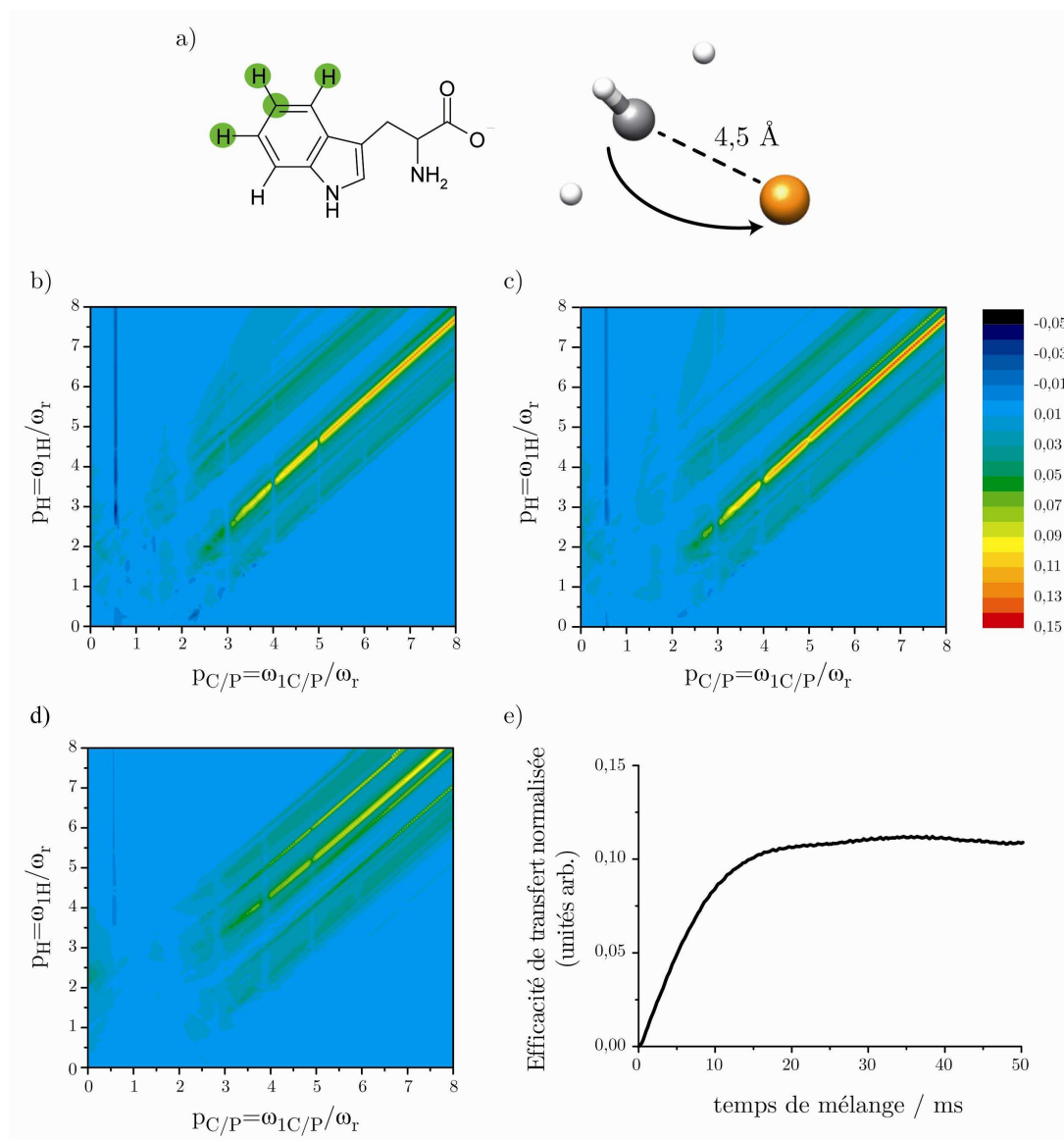


Figure 3-5. Simulations numériques d'un transfert de polarisation PAIN-CP- $\pi$ -shift  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ . (a) Système de spins utilisé dans cette simulation constitué d'un atome de carbone et de trois protons appartenant au tryptophane (entourés en vert, à gauche) et d'un atome de phosphore (en orange, à droite), distant de 4,5 Å du carbone. (b)-(d) Transfert de polarisation PAIN-CP- $\pi$ -shift  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  en fonction des puissances de champs rf proton, carbone et phosphore, exprimées en fonction de la vitesse de rotation, après 10 ms d'irradiation, dans le cas où l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore est égale à (b) 10 ppm, (c) 50 ppm et (d) 100 ppm. (e) Efficacité de transfert PAIN-CP- $\pi$ -shift  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  en fonction du temps de mélange dans le cas où l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore est égale à 10 ppm, dans les conditions suivantes :  $p_C = p_P = 4,4$  et  $p_H = 4$ .

De Paëpe *et al.* ont montré que l'efficacité du mécanisme TSAR est amoindrie par la présence de termes appelés « termes auto-croisés ». Comme expliqué dans le chapitre 7, l'hamiltonien décrivant ces termes lors d'une expérience de corrélation carbone-phosphore PAIN-CP s'écrit ainsi :

$$\tilde{H}_{\text{AUTO}}^{(2)} = \omega_{\text{ZQ}}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{\text{CP},(23)} + \omega_{\text{DQ}}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{\text{CP},(14)} + \lambda T_{10}^H$$

**Equation 3-1**

L'expression analytique du terme  $\omega_{\text{ZQ}}^{\text{AUTO}}$  dans le cas d'un mécanisme ZQ  $\delta p_0$  PAIN-CP, bien que donnée en annexe C, est rappelée ici :

$$\omega_{\text{ZQ}}^{\text{AUTO}} = \frac{1}{\omega_r} \left[ \overbrace{\left( \omega_{\text{PH}}^1 \omega_{\text{HP}}^{-1} - \omega_{\text{CH}}^1 \omega_{\text{HC}}^{-1} \right) \chi(1, p, p_H) + \left( \omega_{\text{PH}}^2 \omega_{\text{HP}}^{-2} - \omega_{\text{CH}}^2 \omega_{\text{HC}}^{-2} \right) \chi(2, p, p_H)}^{\text{Termes auto-croisés ZQ dipolaires}} \right. \\ \left. \underbrace{\frac{(\omega_P^0)^2 - (\omega_C^0)^2}{2p} + \xi(1, p) (\omega_P^1 \omega_P^{-1} - \omega_C^1 \omega_C^{-1}) + \xi(2, p) (\omega_P^2 \omega_P^{-2} - \omega_C^2 \omega_C^{-2})}_{\text{Termes auto-croisés ZQ provenant du déplacement chimique}} \right]$$

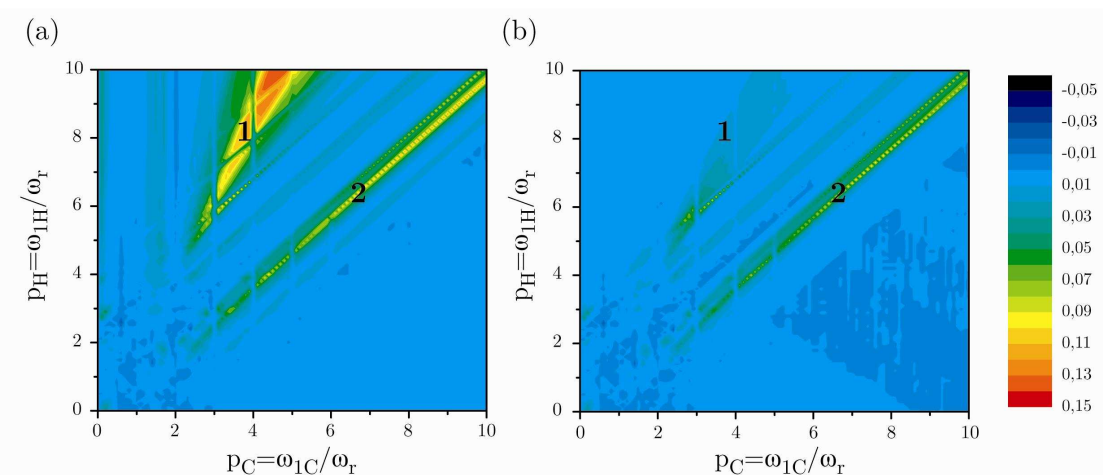
**Equation 3-2**

Bien que l'effet du changement de phase est d'amoindrir ces termes auto-croisés afin d'améliorer l'efficacité du transfert PAIN-CP, la lecture du terme  $\omega_{\text{ZQ}}^{\text{AUTO}}$  nous indique que le transfert est encore amélioré quand la différence entre la valeur du CSA du spin de carbone et celle du spin de phosphore est minimale. La valeur du CSA du carbone est d'environ 100 ppm dans le cas d'un carbone aromatique. La minimisation de cette différence implique donc que le CSA du phosphore doit posséder une valeur proche de 64 ppm. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par simulation (transfert optimal pour une valeur de CSA autour de 50 ppm). L'équation nous indique également qu'il est possible de jouer avec la fréquence de la porteuse. Cet aspect est à l'étude au laboratoire.

### 3.2.2.3 Simulations de transferts DCP

Le transfert d'aimantation  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  lors de l'expérience DCP a également été simulé (Cf. Figure 3-6 (a)) utilisant la première condition de Hartmann et Hahn  $p_P = p_C + 1$ . La lecture de cette carte révèle deux zones où le transfert de polarisation semble être assez efficace. La première zone, correspondant à de hauts champs rf sur la voie proton et notée **1** sur la figure, semble être particulièrement intéressante. Cependant, les sondes actuelles mais aussi les échan-

tillons hydratés ne pourraient supporter facilement de telles puissances pendant plusieurs dizaines de millisecondes. Cette zone n'est donc pas utilisable. La deuxième zone, notée **2**, semble également avoir quelque intérêt, bien que l'efficacité de transfert y soit moins importante que dans la zone équivalente sur la carte de transfert PAIN-CP  $\pi$ -shift (Cf. Figure 3-5). Afin de comprendre la nature exacte du transfert ayant lieu dans cette région de la carte, une deuxième simulation de transfert DCP utilisant la première condition de Hartmann et Hahn  $p_P=p_C+1$  a été réalisée, mais cette fois, sans les couplages dipolaires  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  (Cf. Figure 3-6 (b)). Puisque les couplages dipolaires carbone-phosphore sont dans ce cas absents de la simulation, cette carte ne représente que les transferts de polarisation hétéronucléaires ayant lieu grâce à des mécanismes ne faisant pas intervenir ces couplages, tel que le mécanisme TSAR. Le mécanisme DCP est donc exclu de cette simulation. Le transfert de polarisation apparaissant en zone **2** est présent sur les simulations présentées en (a) et (b) et n'a donc pas lieu via de la polarisation croisée, mais via un mécanisme PAIN-CP où  $p_P=p_C+1$ , qui reste cependant moins efficace que le mécanisme PAIN-CP où  $p_P=p_C$ , dans ce cas. La zone **1**, quant à elle, est bien due à un mécanisme DCP.



**Figure 3-6.** Simulations numériques d'un transfert de polarisation DCP  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ . Le système de spins utilisé dans cette simulation est représenté Figure 3-5 (a). (a) Transfert de polarisation DCP  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  en fonction des puissances de champs rf proton et carbone, exprimées en fonction de la vitesse de rotation, après 10 ms d'irradiation, dans le cas où l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore est égale à 10 ppm. Dans ce cas,  $p_P=p_C+1$ . (b) Transfert de polarisation DCP  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  simulé dans les mêmes conditions que (a) sauf que le couplage dipolaire  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  est exclu de la simulation.

Les simulations nous ont donc permis de valider l'hypothèse que la séquence DCP n'est pas adaptée à la distance que nous voulons mesurer (les puissances de champs rf sont trop élevées). Nous avons également pu confirmer le fait que l'utilisation de la séquence PAIN-CP avec  $\pi$ -shift est préférable à la séquence PAIN-CP. La lecture des cartes de transfert nous a permis de déterminer les conditions de champs rf et le temps de mélange où l'efficacité de transfert est optimale ( $p_C = p_P \approx 4,4$  et  $p_H \approx 4$ , temps de mélange de 8-10 ms). Cependant, dans des conditions raisonnables de champs rf, accessibles avec les sondes de 4mm de diamètre actuelles, le transfert de polarisation entre les atomes de carbone et les atomes de phosphore est au mieux de 13 % seulement ! Ce résultat, en plus des données qui nous sont inconnues, renforce l'impression que cette expérience ne sera pas aisée.

### 3.2.3 Préparation des échantillons

Comme mentionné plus haut, le choix de la RMN du solide nous permet de travailler avec l'échantillon intact de paroi cellulaire de *S. pneumoniae*. La préparation de l'échantillon de paroi bactérienne est identique à celle décrite dans le chapitre 2. La protéine CBPE ou son domaine CBD ont été préparée comme indiqué dans la publication <sup>155</sup>.

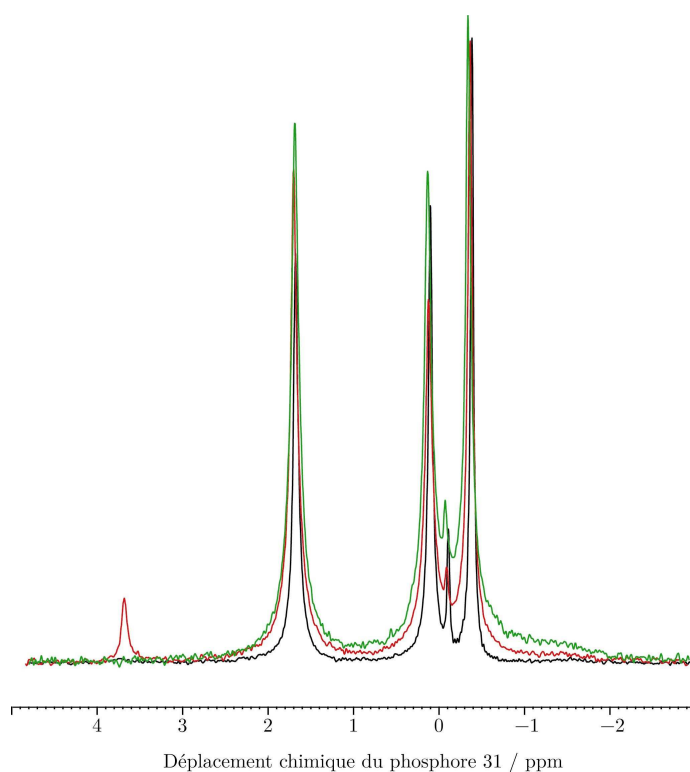
Nous avons dans un premier temps réalisé cette étude d'interactions en présence de la protéine dans son ensemble (domaine liant la choline et domaine catalytique) mais suite à l'observation de la dégradation de notre échantillon de paroi cellulaire due à l'hydrolyse de la phosphorylcholine par CBPE, nous n'avons par la suite utilisé que le domaine liant la choline de CBPE (Cf. paragraphe 3.2.4).

Une solution de paroi cellulaire de *S. pneumoniae* a ensuite été mise en présence du domaine CBD ou de CBPE. L'ensemble a lentement été précipité grâce à une centrifugeuse sous vide (« SpeedVac ») et introduit dans un rotor de 4 mm de diamètre.

### 3.2.4 Résultats expérimentaux

Trois types d'échantillons ont été étudiés : un échantillon de paroi cellulaire de *S. pneumoniae*, un échantillon de paroi cellulaire en interaction avec CBPE et un échantillon de paroi cellulaire en interaction avec le domaine liant la choline de CBPE. Les spectres obtenus par excitation directe obtenus sur ces trois échantillons sont comparés sur la Figure 3-7. Plusieurs faits inté-

ressants peuvent être observés. Tout d’abord, suite à l’introduction de CBPE ou du CBD de CBPE à l’échantillon de paroi cellulaire, un léger élargissement des raies de résonance du phosphore ainsi qu’une légère variation des déplacements chimiques des acides téichoïques (moins de 0,1 ppm) sont constatés, et ce pour tous les pics. Ceci peut être le signe d’une interaction entre les acides téichoïques et la protéine. Cependant, ces effets sont similaires pour les deux pics correspondant aux deux phosphorylcholines. Il n’est donc pas possible avec ces informations de déterminer lequel de ces deux sites est le plus impliqué dans les interactions paroi cellulaire-protéine.



**Figure 3-7.** Spectres obtenus par excitation directe des atomes de phosphore sur un spectromètre Bruker 9,4 T équipé d’une sonde double-résonance 4 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 9$  kHz sur l’échantillon de paroi cellulaire de *S. pneumoniae* (en noir), la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et CBPE entière (en rouge) et la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et le domaine liant la choline de CBPE (en vert). La température du gaz « bearing » était de 268 K, ce qui correspond à une température de 280 K au niveau de l’échantillon. Pendant l’acquisition, du découplage hétéronucléaire CW a été utilisé, avec une puissance de champ rf sur la voie proton de 45 kHz. Le temps d’acquisition était de 200 ms. La puissance de champ rf sur la voie phosphore utilisée lors de l’impulsion à 90° était de 60 kHz. Le nombre de scans accumulés est de 768. Le délai entre deux scans était de 5 s. Une apodisation exponentielle de 5 Hz a été appliquée à la décroissance de l’induction libre.



Une autre différence notable est la présence d'un pic supplémentaire vers 3,7 ppm correspondant à la phosphorylcholine libre sur le spectre de paroi cellulaire en interaction avec CBPE entière. Ce résultat confirme l'activité enzymatique phosphorylcholine estérase de CBPE. Cependant, cette activité catalytique étant très lente dans les conditions de l'expérience, il n'a pas été possible de déterminer des paramètres cinétiques. Enfin, l'aire des deux pics correspondant aux phosphorylcholines a diminué environ de la même façon après ajout de la protéine. Encore une fois, il n'a pas été possible de définir laquelle des deux phosphorylcholines est la plus concernée par l'activité catalytique de CBPE.

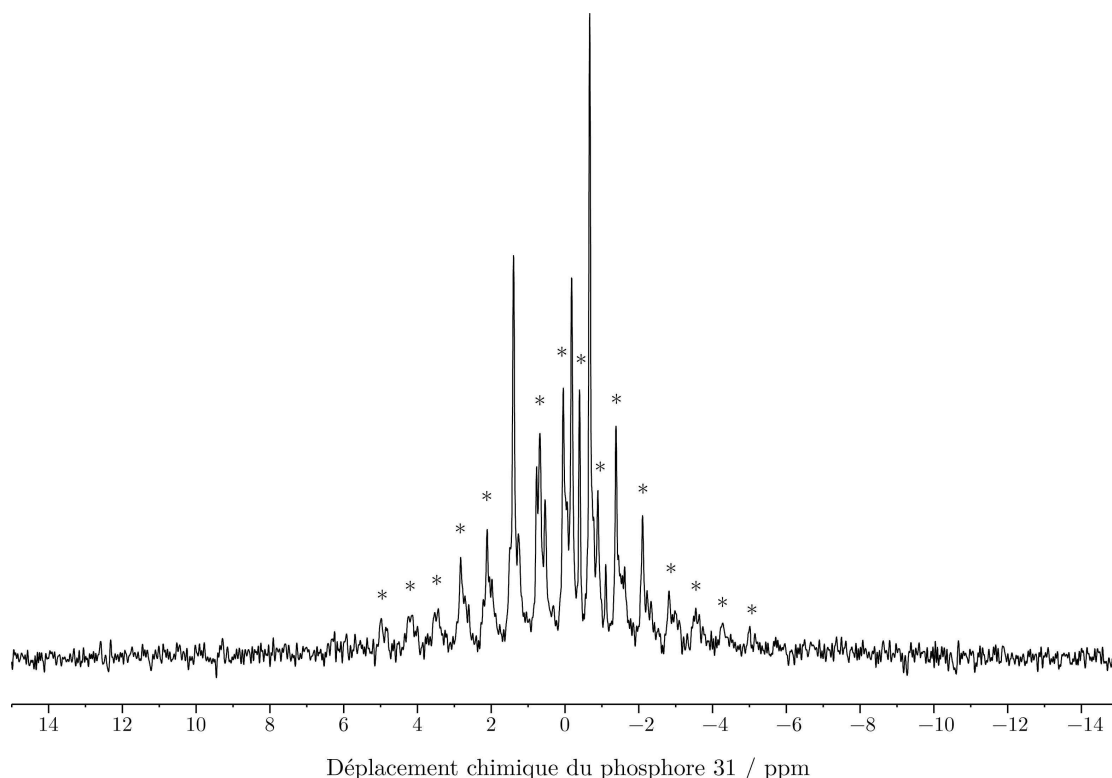
Des mesures de constantes de temps de relaxation longitudinales ont été effectuées par inversion-récupération à la fois sur l'échantillon de paroi cellulaire de *S. pneumoniae* mais aussi sur l'échantillon de paroi cellulaire en interaction avec CBPE entière. Une très légère diminution des constantes de temps a été observée pour tous les pics, sans qu'il soit possible encore une fois de faire une distinction entre les deux pics de phosphorylcholines.

Nous avons ensuite souhaité avoir une estimation de l'anisotropie de déplacement chimique des atomes de phosphore portés par les acides téichoïques. Pour cela, nous avons enregistré le spectre de la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et du domaine liant la choline de CBPE à très basse vitesse de rotation (105 Hz) (Cf. Figure 3-8). Le spectre observé comporte de nombreuses bandes de rotation sur une plage d'environ 10 ppm, valeur que nous attribuons donc approximativement à la valeur du CSA des atomes de phosphore.

Il y a alors plusieurs hypothèses. Il serait possible que malgré la présence de la protéine, les acides téichoïques restent très mobiles. Une autre éventualité est la suivante : si les acides téichoïques en interaction avec la protéine sont effectivement plus rigides, le CSA de cette partie des acides téichoïques est donc plus élevé. L'intensité du pic isotrope doit donc être répartie dans de nombreuses bandes de rotation. Comme la partie des acides téichoïques en interactions avec CBPE est plutôt modeste, la sensibilité de ces bandes de rotation peut donc être trop faible pour que les signaux soient détectables par rapport à la sensibilité des pics isotropes et des bandes de rotation de la partie des acides téichoïques qui n'interagissent pas avec la protéine. Rappelons que selon les simulations montrées en Figure 3-5, la valeur de 10 ppm ne semble pas optimale pour le transfert PAIN-CP.

Les acides téichoïques étant très mobiles (voir chapitre 2) et donc les interactions dipolaires mettant en jeu ces noyaux étant très moyennées, nous avons essayé de diminuer la température de l'échantillon jusqu'à observation d'un élargissement des raies afin d'augmenter la valeur de ces interactions et donc le transfert  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ . La température a été variée de 298 K à 266 K sans

que le spectre ne soit foncièrement modifié. Nous n'avons pas souhaité descendre davantage la température de peur d'endommager l'échantillon. Ces expériences nous ont cependant permis d'estimer le CSA des atomes de phosphore à environ 10 ppm.



**Figure 3-8.** Spectre obtenu par excitation directe des atomes de phosphore sur l'échantillon de paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et le domaine liant la choline de CBPE sur un spectromètre Bruker 9,4 T équipé d'une sonde double-résonance 4 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 105$  Hz. Les astérisques au-dessus de certains pics signalent les bandes de rotation. Le spectre a été enregistré à 266 K. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire CW a été utilisé, avec une puissance de champ rf sur la voie proton de 45 kHz. Le temps d'acquisition était de 125 ms. La puissance de champ rf sur la voie phosphore utilisée lors de l'impulsion à  $90^\circ$  était de 80 kHz. Le nombre de scans accumulés est de 256. Le délai entre deux scans est de 3 s. Une apodisation exponentielle de 2 Hz fut appliquée à la décroissance de l'induction libre.

Enfin, lors d'une semaine d'expériences sur la plateforme SON NMR LSF à Utrecht aux Pays-Bas, nous avons pu tester la séquence PAIN-CP avec  $\pi$ -shift sur notre échantillon de paroi cellulaire en interaction avec le domaine liant la choline de CBPE. Les conditions d'expériences sont similaires à celles utilisées lors des simulations : le spectromètre était un Bruker 500 MHz et la vitesse de rotation était de 11 kHz. La température était de 268 K. Grâce aux

cartes de transfert simulées, nous avons choisi les puissances de champs rf à appliquer sur les voies proton, carbone et phosphore afin de créer un mécanisme TSAR. Ces conditions étaient les suivantes :  $p_C=p_P=4,55$  et  $p_H=4,15$ . Malgré tout, aucun transfert  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  n'a pu être observé, même lors d'une expérience 1D où le signal a été accumulé pendant 5 jours.

### 3.2.5 Conclusion

La détection de transferts à longue distance entre les atomes de phosphore des acides téichoïques et les atomes de carbone de la protéine CBPE n'a pas été réalisable grâce à la séquence PAIN-CP. Il est possible que la trop grande mobilité des chaînes d'acides téichoïques, ainsi que la faible proportion d'acides impliqués dans les interactions avec la protéine aient rendu cette expérience très peu sensible. Il serait peut-être judicieux de mettre en place l'expérience PAIN-CP avec  $\pi$ -shift sur des molécules modèles plus petites. Par exemple, il serait peut être possible d'étudier uniquement les chaînes d'acides téichoïques ou bien des fragments d'acides téichoïques en interactions avec la protéine CBPE ou son domaine CBD. Nous pourrions également envisager de tester l'efficacité des séquences de type TEDOR sur de tels systèmes puis sur la protéine en interaction avec la paroi cellulaire bactérienne. Une autre idée intéressante qui nous a été proposée lors de notre visite à Utrecht est d'étudier nos échantillons grâce à des techniques en détection proton. En effet, comme les acides téichoïques sont assez mobiles, il serait possible d'obtenir des spectres de résonance du proton possédant une très bonne résolution. Des techniques utilisées couramment en RMN des solutions telles que des expériences NOESY pourraient être utilisées pour détecter des interactions entre les protons des acides téichoïques et ceux de la protéine. Cependant, cette approche nécessite de préparer des échantillons deutérés. Enfin, afin d'augmenter la sensibilité de l'expérience, le système entier (paroi cellulaire et protéine) pourrait être étudié par polarisation nucléaire dynamique (ou DNP), lorsque cette technique aura vu sa résolution sensiblement améliorée et que les séquences que nous voulons utiliser auront été validées sur un spectromètre équipé d'un gyrotron.

L'exemple de CBPE démontre bien que la RMN en phase solide a encore besoin de voir ses méthodes se développer. L'amélioration de la sensibilité des expériences est un premier axe de travail indispensable. Le développement de séquences de recouplage permettant de détecter des contacts à plus longue distance, en plus grand nombre et plus facilement en est un deuxième. Lors de cette thèse, nous avons également travaillé sur ces deux points. Dans un pre-

mier temps, nous avons mis en évidence un phénomène permettant d'accélérer l'acquisition des spectres ou d'augmenter la sensibilité des expériences. Un autre axe de recherche poursuivi pendant ces trois ans repose sur l'amélioration de séquences de recouplage existantes afin de les rendre plus efficaces. Ces études font l'objet des deux parties suivantes.



**Partie II**  
**RMN en phase solide et sensibilité**



## Chapitre 4

---

### Méthodes rapides d'acquisition de spectres par RMN





## 4. Méthodes rapides d'acquisition de spectres par RMN

En 1966, Richard Ernst découvrait que la sensibilité de la RMN pouvait être significativement améliorée par l'application d'impulsions radiofréquence, modification qui permet d'enregistrer le signal émis par les noyaux en fonction du temps. Ernst comprit également qu'il était possible de convertir ce signal en spectre RMN par application de la transformation de Fourier <sup>14</sup>.

En 1971, lors d'une école d'été en Yougoslavie, Jean Jeener introduisait le concept de RMN à deux dimensions, grâce à la double transformation de Fourier. Cette idée fut reprise et développée par Richard Ernst et ses collaborateurs et conduisit à la publication d'un article fondant réellement la spectroscopie RMN à deux dimensions <sup>15</sup>. Ernst obtint le prix Nobel de chimie en 1991 pour ses travaux fondateurs. Grâce à ces avancées majeures, la RMN multidimensionnelle devint un outil essentiel aux spectroscopistes, étendant considérablement les capacités de la RMN impulsionnelle à une dimension.

Le passage à plusieurs dimensions permet de résoudre le problème de la superposition des pics apparaissant sur les spectres 1D. Cette multidimensionalité autorise également la mise en lumière de corrélations entre les différents noyaux observés, et ce par différents mécanismes, traduisant une proximité à travers l'espace ou la présence de liaisons covalentes. La RMN a ainsi pu prendre toute sa place dans des domaines tels que la chimie et la biologie, comme en témoignent les 8500 structures tridimensionnelles de protéines résolues par RMN à ce jour et déposées à la Protein Data Bank (PDB) <sup>176</sup>.

Cependant, la RMN multidimensionnelle souffre d'un problème majeur : l'acquisition d'un spectre est très long, cet inconvénient devenant de plus en plus important avec le nombre de dimensions. Cette limitation peut être un gêne par exemple pour l'étude d'échantillons ayant une durée de vie limitée. De nombreuses approches ont été développées ces dernières années afin de résoudre cette difficulté.

Lors de cette thèse, nous avons également cherché un moyen de réduire le temps d'acquisition d'une expérience de RMN en phase solide. Avant de décrire notre approche dans un prochain chapitre, nous consacrerons la première partie de celui-ci à une description plus poussée de la RMN multidimensionnelle, avant de voir quelles sont les limitations de cette méthode. Enfin, dans une deuxième partie, nous donnerons une vue d'ensemble des techniques développées jusqu'à présent afin d'accélérer la spectroscopie RMN en phase liquide et solide multidimensionnelle. Nous nous limiterons aux séquences d'impulsions, les progrès instrumentaux étant laissés de côté.

## 4.1 La RMN multidimensionnelle

### 4.1.1 Principes de la RMN multidimensionnelle

La RMN multidimensionnelle repose sur le même principe que la RMN en une dimension, qui consiste à enregistrer un signal en fonction du temps  $s(t)$  avant de le transformer en données dépendantes de la fréquence  $S(\omega)$  grâce à une transformation de Fourier <sup>177</sup>:

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} s(t) \times \exp^{-i\omega t} dt \quad \text{Equation 4-1}$$

Cependant, dans le cas multidimensionnel, le signal dépend de multiples variables temporelles indépendantes. Dans le cas le plus simple bidimensionnel, une double transformation de Fourier permet d'obtenir un spectre en deux dimensions :

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} s(t_1, t_2) \times \exp^{-i\omega_1 t_1} \times \exp^{-i\omega_2 t_2} dt_1 dt_2 \quad \text{Equation 4-2}$$

La comparaison avec le cas monodimensionnel n'est pas si aisée. En effet, alors qu'il est possible d'enregistrer facilement le signal  $s(t)$  induit dans la bobine, la détection du signal  $s(t_1, t_2)$  selon les deux dimensions temporelles n'est pas réalisable physiquement de façon simultanée. Il convient donc de recourir à une astuce afin de créer une deuxième dimension temporelle, appelée dimension « indirecte ». L'acquisition du signal est effectuée en enregistrant de multiples fois la même expérience, détectant la totalité du domaine temporel  $t_2$  (la dimension « directe ») mais en incrémentant entre chaque répétition le délai  $t_1$ , représentant l'évolution du signal dans la dimension indirecte (Cf. Figure 4-3 (a)). Une séquence RMN bidimensionnelle est donc constituée de quatre parties :

- la préparation : période pendant laquelle les spins sont excités ;
- l'évolution : période pendant laquelle le délai  $t_1$  est incrémenté régulièrement ;
- le mélange : cette période permet un échange d'aimantation entre les spins ;

- l'acquisition : période  $t_2$  pendant laquelle le signal est enregistré physiquement.

Sur le spectre bidimensionnel, la présence d'un signal aux fréquences  $(\omega_1, \omega_2)$  indique l'existence d'interactions entre les spins résonants aux fréquences  $\omega_1$  et  $\omega_2$ . L'extension de cette technique à d'autres dimensions est assez simple : il suffit d'ajouter des périodes d'évolution et de mélange pour chaque dimension supplémentaire souhaitée.

#### 4.1.2 RMN multidimensionnelle et temps d'acquisition

Le temps nécessaire à l'enregistrement d'un spectre multidimensionnel  $T_{\text{exp}}$  peut être exprimé ainsi :

$$T_{\text{exp}} = T_{\text{scan}} \times n_{\text{scan}} \times \underbrace{(n_1 \times n_2 \times \dots \times n_i)}_{\substack{\text{nombre d'incr\'ements} \\ \text{dans les dimensions indirectes}}} \quad \text{Equation 4-3}$$

$T_{\text{scan}}$  est le temps nécessaire à la réalisation d'une acquisition. Ce délai comprend à la fois le temps nécessaire à l'exécution de la séquence d'impulsions mais aussi le temps entre chaque scan permettant à l'aimantation de revenir à l'équilibre.  $n_{\text{scan}}$  représente le nombre de répétitions (ou nombre de scans) nécessaires à une bonne sensibilité. Finalement,  $n_i$  est le nombre d'incr\'ements dans la dimension indirecte  $i$ .

Dans un article de revue récent <sup>178</sup>, Paul Schanda calcule les temps d'acquisition suivants : en phase liquide et dans le cas de macromolécules biologiques, un spectre 1D prend 2 secondes ; un spectre 2D, 3 minutes ; un spectre 3D, 11 heures ; un spectre 4D, 92 jours et un spectre 5D, 600 mois. Ce calcul peut également être fait dans le cas de la RMN en phase solide. Considérons le cas où le temps imparti à la réalisation d'un scan est de 3 secondes. Le nombre de scan nécessaire à une bonne sensibilité en RMN multidimensionnelle pour un échantillon biologique est de l'ordre de 128. Enfin, le nombre d'incr\'ements permettant d'obtenir un spectre résolu est d'environ 400 (ou 10 ms d'évolution) si l'on considère un noyau de carbone. Dans ce cas, un spectre 1D prend 6 minutes ; un spectre de corrélation carbone-carbone (2D), 1,5 jour ; un spectre 3D (trois dimensions carbone), 2 ans et un spectre 4D (quatre dimensions carbone), 150 ans ! A cause de ces longues périodes d'acquisition, les spectres 4D et 5D en RMN en phase liquide ainsi que les spectres 3D en phase solide sont très rares et ne sont enregistrés que lorsque le

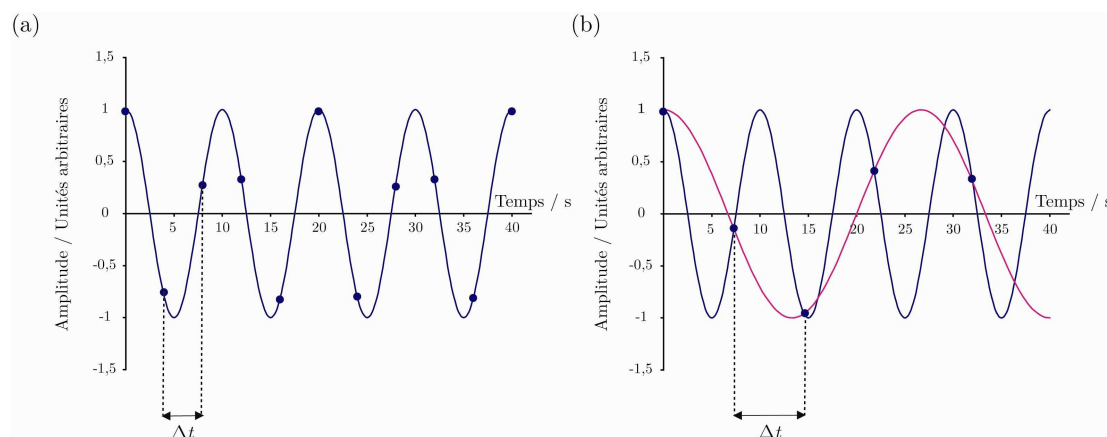
nombre d'incrémentes peut être réduit par quelque artifice. Ces chiffres illustrent parfaitement le besoin qu'ont les spectroscopistes de développer et d'appliquer des méthodes permettant de réduire les temps expérimentaux.

#### 4.1.3 RMN multidimensionnelle et résolution

Lors de l'enregistrement d'un signal de précession libre en RMN (ou « Free Induction Decay », FID), le signal est échantillonné à intervalles réguliers, séparés par  $\Delta t$ . Le théorème de Nyquist<sup>179, 180</sup> stipule que la fréquence la plus élevée qui pourra être correctement numérisée est la suivante :

$$f_n = \frac{1}{2 \times \Delta t} \quad \text{Equation 4-4}$$

Autrement dit, une fréquence ne sera correctement numérisée que si au moins deux points sont enregistrés au cours de sa période. Les fréquences supérieures à  $f_n$  ne sont pas correctement échantillonnées et apparaissent comme plus basses que ce qu'elles sont réellement (Cf. Figure 4-1). Ces fréquences se traduisent sur le spectre RMN après transformation de Fourier par un recouvrement spectral appelé crénelage, repliement ou encore *aliasing*.



**Figure 4-1. Théorème de Nyquist.** (a) Fréquence d'échantillonnage  $1/\Delta t$  permettant de numériser correctement le signal analogique sinusoïdal bleu. (b) Fréquence d'échantillonnage trop faible, pour laquelle il est impossible de distinguer ce qui appartient au signal bleu de fréquence  $f$  de ce qui appartient au signal rose de fréquence  $1/\Delta t - f$ .

La fenêtre spectrale  $sw$  pouvant être correctement observée correspond à l'intervalle  $-f_n < \nu < f_n$  et dépend de l'intervalle d'échantillonnage :

$$sw = 2 \times f_n = \frac{1}{\Delta t} \quad \text{Equation 4-5}$$

La résolution digitale  $\Delta f$  est reliée au nombre de points  $n_i$  qui doivent être échantillonnés et donc au temps maximal d'échantillonnage  $t^{\max}$  :

$$\Delta f = \frac{sw}{n_i} = \frac{1}{n_i \times \Delta t} = \frac{1}{t^{\max}} \quad \text{Equation 4-6}$$

Dans le cas d'une expérience à deux dimensions par exemple, il découle des équations 4-3 et 4-6 que plus la résolution digitale souhaitée est bonne (soit  $\Delta f$  est petit), plus le temps  $t_1^{\max}$  dans la dimension indirecte sera long et donc plus le temps expérimental total sera important.

#### 4.1.4 Sensibilité et RMN

La sensibilité d'une expérience est définie par le rapport entre la valeur du signal et la valeur du bruit par unité de temps. Cette sensibilité est proportionnelle à de nombreux facteurs, qui sont exprimés dans cette équation <sup>181</sup>:

$$\left( \frac{S}{N} \right)_t = \frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}} \times \frac{1}{\text{unité de temps expérimental}} \quad \text{Equation 4-7}$$

$$\propto \frac{N_{spins}}{V} \times \gamma_{exc} \times \gamma_{det}^{3/2} \times B_0^{3/2} \times n_s^{1/2} \times \frac{1}{\sqrt{R_e(T_a T_e) + R_b(T_a T_b)}}$$

où  $N_{spins}/V$  est le nombre de spins par unité de volume ;  $\gamma_{exc}$  et  $\gamma_{det}$ , les rapports gyromagnétiques des spins excités et détectés, respectivement ;  $B_0$ , le champ magnétique principal ;  $n_s$ , le nombre de scans ;  $R_e$ , la résistance électrique de l'échantillon ;  $R_b$ , celle de la bobine ;  $T_a$ , la température du préamplificateur ;  $T_e$ , celle de l'échantillon et  $T_b$ , celle de la bobine.

Très souvent, il est nécessaire d'accumuler de nombreux scans afin d'améliorer la sensibilité de l'expérience. L'accumulation de  $n_s$  scans aug-

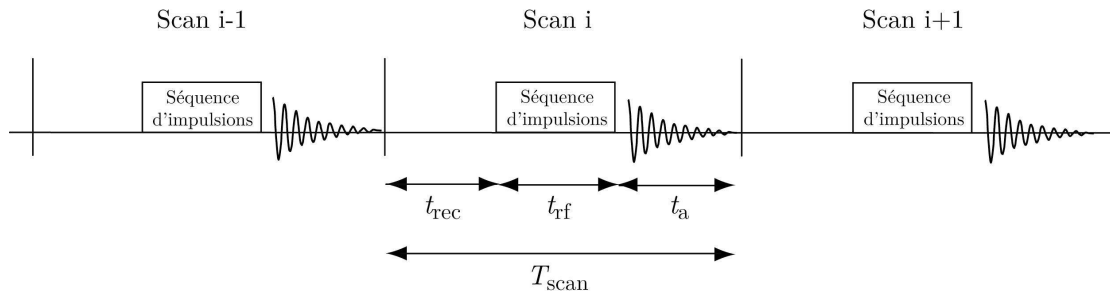
mente le signal  $n_s$  fois alors que le bruit augmente  $\sqrt{n_s}$  fois, ce qui permet une augmentation de la sensibilité d'un facteur  $\sqrt{n_s}$ .

Il est également possible d'augmenter la sensibilité d'une expérience en jouant sur tous les autres paramètres indiqués dans l'équation 4-7. Par exemple, les protons sont très souvent détectés dans les expériences de RMN en phase liquide, puisqu'ils possèdent un haut rapport gyromagnétique. De même, en RMN en phase solide, où le signal des hétéroatomes est très souvent détecté, de nombreuses expériences commencent par une étape de polarisation croisée, qui permet de transférer l'aimantation des protons vers les hétéroatomes et d'augmenter la polarisation de ces derniers d'un facteur correspondant au ratio des rapports gyromagnétiques. L'augmentation des champs magnétiques principaux donne lieu aussi à une augmentation du signal sur bruit. Les plus hauts champs créés par une bobine supraconductrice disponibles à ce jour atteignent 23,5 Tesla. Un autre exemple de développement technologique améliorant la sensibilité est la mise au point de sondes cryogéniques, où la température de la bobine ainsi que celle du préamplificateur sont diminuées.

La sensibilité par unité de temps d'une expérience dépend également des différents temps caractéristiques d'une séquence RMN <sup>182, 183</sup> :

$$\left(\frac{S}{N}\right)_t \propto \frac{(1 - \exp(-t_{rec}/T_1)) \times \sin \beta}{1 - \exp(-t_{rec}/T_1) \times \cos \beta} \times \frac{1}{\sqrt{T_{scan}}} \quad \text{Equation 4-8}$$

Ces temps sont illustrés sur la Figure 4-2.  $T_{scan}$  est le temps total nécessaire à la réalisation d'un scan. Ce temps est composé du délai entre chaque scan  $t_{rec}$  pendant lequel les spins peuvent récupérer leur aimantation, de la durée de la séquence  $t_{rf}$  et du temps d'acquisition  $t_a$ .  $\beta$  est l'angle de bascule de l'impulsion d'excitation et  $T_1$  la constante de temps de relaxation des spins mis en jeu.



**Figure 4-2.** Représentation schématique de la répétition successive d'une séquence d'impulsions et des délais qui lui sont associés.

L'équation 4-8 révèle qu'il existe un délai optimal  $t_{rec}$  qui permet de maximiser le signal sur bruit. Dans le cas d'un angle de bascule de  $\pi/2$ , ce délai est égal à environ 1,25 fois  $T_1$ .

#### 4.1.5 Pertinence de la RMN multidimensionnelle rapide en chimie et biologie

Les longs temps d'acquisition des spectres multidimensionnels peuvent être désavantageux pour l'étude de macrosystèmes biologiques.

- (1) De nombreux systèmes tendent à se dégrader avec le temps. Il est donc de première importance d'être capable d'enregistrer les expériences dans le temps pendant lequel l'échantillon étudié est stable.
- (2) L'étude de biopolymères de plus en plus complexes nécessiterait l'évolution des spectres vers de plus grandes dimensions (4 ou 5D en routine en RMN liquide et 3 et 4D dans le cas de la RMN en phase solide).
- (3) Le temps nécessaire à l'enregistrement des données est très coûteux.
- (4) L'étude de phénomènes biologiques tels que le suivi d'une réaction en temps réel n'est pas accessible par des méthodes de RMN multidimensionnelles conventionnelles.
- (5) En RMN en phase solide plus particulièrement, les séquences d'impulsions utilisent souvent des champs rf à des puissances très élevées, notamment pendant la période de découplage. L'acquisition d'un spectre multidimensionnel pendant un long laps de temps peut être problématique et mener à l'échauffement de l'échantillon, notamment lorsque ceux-ci sont hydratés et en milieu salin.
- (6) Enfin, la dérive des champs, ou le phénomène de décroissance du champ magnétique  $B_0$  au fil du temps, peut conduire à un élargissement des raies lors de longues périodes d'acquisition. Ceci est particulièrement vrai en RMN en phase solide, qui est dépourvue de « lock ». Dans ce cas, la dérive est de l'ordre de quelques Hertz par heure.

Au vue de ces multiples limitations, de nombreuses méthodes sont apparues ces dernières années dans le but d'accélérer l'acquisition de spectres multidimensionnels. Ces techniques peuvent être classées en deux catégories. La première englobe toute technique échantillonnant différemment les temps dans les dimensions indirectes et réduisant donc le nombre de scans. La deuxième comporte les méthodes visant la réduction du temps entre chaque scan. Ces différentes techniques font l'objet des deux parties suivantes.



## 4.2 Accélération de l'acquisition d'un spectre multidimensionnel : réduction du nombre de scans via un échantillonnage différent

Toutes les techniques expliquées ci-dessous ont d'abord été développées en RMN des solutions. Certaines d'entre elles ont ensuite été importées à la RMN en phase solide. S'il n'est pas fait mention de la branche de la RMN dans laquelle sont utilisées les techniques décrites ci-après, cela signifie qu'il est question de RMN en phase liquide.

### 4.2.1 *Echantillonnage aléatoire*

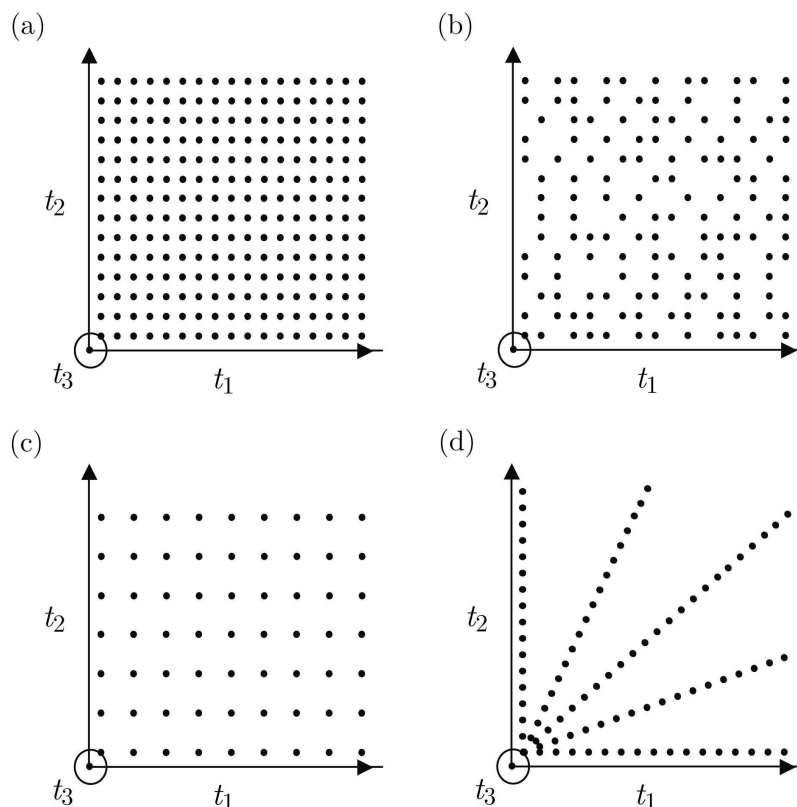
L'approche la plus simple permettant de réduire le nombre d'incrémentes est de sélectionner certains points  $(t_1, t_2)$  de façon aléatoire, comme illustré sur la Figure 4-3 (b). Il n'est cependant plus possible dans ce cas d'utiliser une transformation de Fourier discrète, qui nécessite un échantillonnage linéaire uniforme, afin d'obtenir les données dans le domaine des fréquences. De nombreux algorithmes de traitements de données, qui n'utilisent pas la transformation de Fourier, ont donc dû être développés. Parmi ceux-ci, citons la méthode de diagonalisation filtrée (« filter diagonalization method »)<sup>184, 185</sup>, la méthode de l'entropie maximum (« maximum entropy methods »)<sup>186</sup>, la décomposition en trois domaines (« three-way decomposition »)<sup>187</sup>, la décomposition multidimensionnelle récursive (« recursive multidimensional decomposition »)<sup>188, 189</sup>, l'interpolation de Lagrange suivie d'une transformation de Fourier classique<sup>190</sup>, la transformation de Fourier de données échantillonnées non-linéairement<sup>191, 192</sup> et l'analyse de la covariance<sup>193-195</sup>. Il est intéressant de remarquer qu'il n'est pas nécessaire de modifier les séquences d'impulsions utilisées traditionnellement lors de l'application de tels algorithmes. Seul l'échantillonnage est différent.

### 4.2.2 *Le repliement de spectres*

Comme expliqué dans le paragraphe 4.1.3, quand  $\Delta t$  est trop grand (Cf. Figure 4-3 (c)), les fréquences sont mal échantillonnées. Ceci se traduit par un recouvrement des raies ou repliement spectral qui peut mener à une mauvaise interprétation des données, les pics pouvant être mal attribués.

Cependant, ce phénomène peut également être utilisé à son avantage. En effet, si la position des pics sur le spectre est déjà connue, il est possible de

faire en sorte que les pics repliés apparaissent dans une zone pauvre en pics ou bien dans une région ne présentant pas d'intérêt lors de l'étude en cours. Il est ainsi possible de réduire considérablement la fenêtre spectrale dans la ou les dimension(s) indirecte(s) et donc le temps expérimental<sup>196, 197</sup>.



**Figure 4-3.** Echantillonnage dans les deux dimensions indirectes  $t_1$  et  $t_2$ , dans le cas d'expériences tridimensionnelles. Chaque point correspond à une répétition de la séquence d'impulsion dans la dimension directe  $t_3$ . (a) Echantillonnage standard. (b) Echantillonnage aléatoire. (c) Echantillonnage utilisé lors de repliement de spectres. (d) Echantillonnage utilisé lors de la RMN par projection.

#### 4.2.3 Dimensionnalité réduite ou RMN par projection

Cette technique visant à réduire le nombre d'incrément dans la ou les dimension(s) indirecte(s) est apparue dans les années 1990 en RMN des solutions et est connue sous le nom de « RMN à dimensionnalité réduite » ou « RMN par projection »<sup>198, 199</sup>. Cette technique est expliquée ici en prenant l'exemple d'un spectre tridimensionnel mais peut aisément se généraliser à de plus hautes dimensions<sup>200</sup>.

Lors d'une expérience tridimensionnelle classique, les spins peuvent évoluer pendant deux dimensions indirectes :  $t_1$  et  $t_2$ . L'idée de l'approche de la

dimensionnalité réduite est de les laisser évoluer pendant des délais  $t_1$  et  $t_2 = \lambda \times t_1$ . Une représentation schématique de l'échantillonnage utilisé lors de cette technique RMN est donnée en Figure 4-3 (d). Cette incrémentation correspond à un échantillonnage des données le long d'axes inclinés, où l'angle d'inclinaison  $\alpha$  est défini de la façon suivante :

$$\lambda = \Delta t_2 / \Delta t_1 = \tan^{-1}(\alpha) \quad \text{Equation 4-9}$$

Comme les données sont échantillonnées normalement le long de ces axes inclinés, il est possible de leur appliquer une transformation de Fourier. Cette transformation de Fourier permet d'obtenir des pics de corrélation aux fréquences  $\omega_1 \pm \lambda \times \omega_2$ ,  $\omega_1$  et  $\omega_2$  correspondant aux fréquences des spins évoluant pendant les périodes  $t_1$  et  $t_2$ . Ces pics peuvent être visualisés comme des doublets aux fréquences  $\omega_1 \pm \lambda \times \omega_2$ <sup>198, 199</sup> ou bien séparés en sous-spectres, et visualisés comme un seul pic, centré aux fréquences  $\omega_1 + \lambda \times \omega_2$  ou  $\omega_1 - \lambda \times \omega_2$ <sup>201</sup>, selon la façon dont est effectuée la détection quadrature.

Deux principales méthodes ont été développées afin d'analyser les données obtenues et de connaître la position et l'intensité des pics<sup>202, 203</sup>. La première approche permet l'obtention d'une liste de déplacements chimiques, extraits des spectres à dimensionnalité réduite par calcul mathématique. Cette étape peut être effectuée en utilisant divers outils tels que GFT NMR<sup>200, 204</sup>. La deuxième approche, par analogie avec les techniques développées en tomographie de rayons X, permet de reconstruire un spectre tridimensionnel à partir de spectres en deux dimensions, ces derniers spectres pouvant être visualisés comme des projections du spectre 3D sur différents plans<sup>205-207</sup>.

Cette dernière technique se base sur le théorème de projection de Radon : une droite passant par l'origine d'un signal bidimensionnel  $s(t_1, t_2)$ , faisant un angle  $\alpha$  avec l'axe  $t_1$ , peut être transformée par transformation de Fourier en une projection sur une droite passant par l'origine d'un signal bidimensionnel  $S(\omega_1, \omega_2)$ , faisant le même angle  $\alpha$  avec l'axe  $\omega_1$ . Ce concept peut être étendu au cas de la spectroscopie tridimensionnelle où la projection sur un plan incliné est possible par double transformation de Fourier d'un signal enregistré pendant que  $t_1$  et  $t_2$  sont variés simultanément. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle peut produire des artefacts sur le spectre reconstruit.

L'avantage majeur de la méthode à dimensionnalité réduite est qu'elle diminue considérablement le temps expérimental et qu'elle donne donc accès à des expériences en quatre ou cinq dimensions. Cependant, il est préférable d'appliquer cette technique à des systèmes présentant peu de pics de corréla-

tions de façon à éviter tout repliement de spectres dans les spectres de projection.

En RMN en phase solide, la technique de dimensionnalité réduite est très peu développée. Cependant, Robert Griffin et ses collaborateurs ont démontré en 2001 sa faisabilité avec succès <sup>208</sup>. Des spectres 3D du type CONCA ont pu être enregistrés sous la forme d'expériences bidimensionnelles.

En 2007, Thomas Vosegaard a proposé une technique appelée SLF-PRODI, pour « SLF Projection Reconstruction of One-Dimensional spectra » <sup>209</sup>. Les expériences de type SLF sont très utilisées pour l'étude de peptides et protéines orientés. Elles corrélient le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  des amides du squelette avec le déplacement chimique de l'azote. Vosegaard a proposé d'enregistrer les différents spectres CPDAS (1D) nécessaires à la reconstruction d'un spectre bidimensionnel SLF en faisant varier le type de découplage appliqué pendant l'acquisition. Cette technique exploite le fait que les différents types de découplage homonucléaires appliqués ne vont pas annuler les couplages hétéronucléaires mais seulement les réduire par un facteur correspondant au facteur d'échelle du bloc de découplage. Ceci implique que de telles séquences échantillonnent à la fois le déplacement chimique de l'azote mais aussi les couplages dipolaires  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , ce qui correspond à une incrémentation simultanée des délais  $t_1$  et  $t_2$  dans le cas d'expériences de type SLF. Vosegaard a reporté un gain de temps d'un ordre de grandeur.

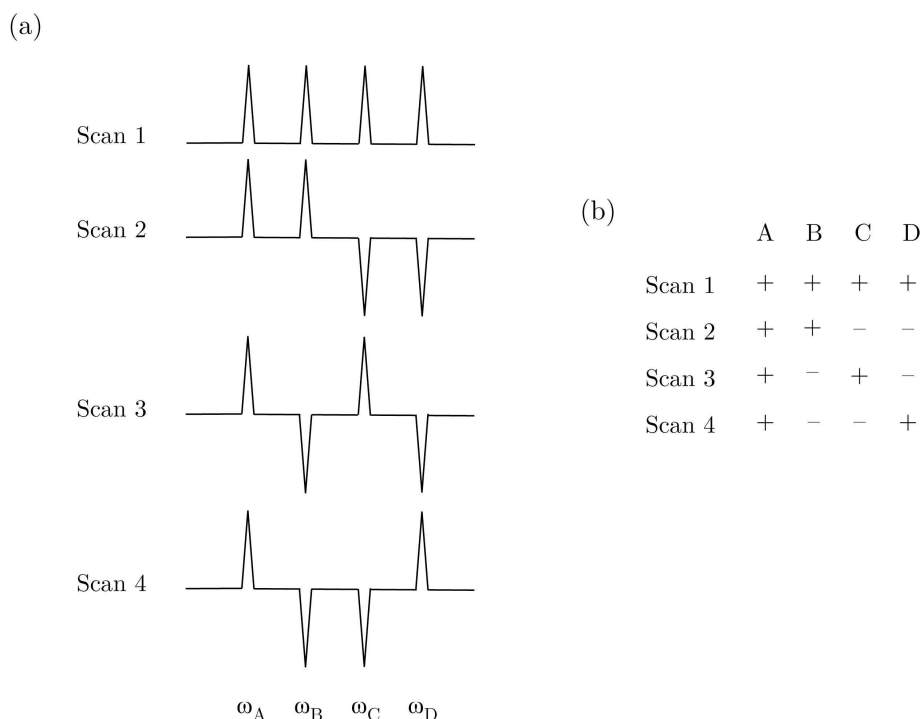
Enfin, en 2007, Thomas Vosegaard et Dominique Massiot ont introduit une méthode intitulée CQ-PRODI, pour « Quadrupolar Projection-Reconstruction of One Dimensional spectra » <sup>210</sup>. Ils ont démontré qu'il est possible de reconstruire un spectre 2D corrélant le déplacement chimique d'un noyau quadripolaire avec sa forme de raie quadripolaire au second ordre en enregistrant des spectres 1D à différents champs magnétiques.

#### 4.2.4 RMN par filtrage Hadamard

Un spectre RMN est souvent difficile à attribuer surtout si le nombre de noyaux constituant la molécule étudiée est important. Un moyen d'améliorer la résolution de ce type de spectre est de marquer isotopiquement certains atomes (par exemple tous les carbones du résidu histidine dans le cas de protéines) et d'observer uniquement ces noyaux. Cependant, cette technique nécessite de marquer isotopiquement plusieurs échantillons de façon différente et s'avère donc très coûteuse.

L'application d'impulsions sélectives en RMN est une alternative à ce marquage isotopique intense. Prenons l'exemple d'un spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . La période d'évolution dans la dimension indirecte peut être remplacée

par une impulsion sélective manipulant seulement un atome d'azote. Le spectre 1D obtenu ne contient que des raies de protons couplés à l'azote sélectionné. Ce spectre 1D est en fait une ligne du spectre bidimensionnel correspondant à la fréquence de l'azote sélectionné. L'inconvénient majeur de cette technique est que reconstruire un spectre 2D dans son ensemble prend énormément de temps, chaque résonance dans la dimension azote étant scannée l'une après l'autre.



**Figure 4-4. Spectroscopie par filtrage Hadamard illustrée sur un exemple d'un spectre comportant quatre raies et l'utilisation d'une matrice H-4. (a) Les quatre pics A-D sont manipulés par des impulsions sélectives de façon à être soit positifs, soit négatifs. (b) Les spectres contenant seulement une raie (A, B, C ou D) peuvent être reconstitués en sommant les quatre scans suivant la matrice de Hadamard. Illustration traduite de la référence <sup>178</sup>.**

La spectroscopie par filtrage Hadamard permet de résoudre ce problème. Plutôt que d'appliquer une seule impulsion sélective, un ensemble d'impulsions est appliqué en même temps de façon à exciter différents spins simultanément. Plusieurs scans sont enregistrés de la sorte, mais entre chaque scan, l'impulsion sélective est légèrement modifiée de façon à obtenir des signaux positifs ou négatifs, suivant une matrice de Hadamard (Cf. Figure 4-4). Les pics individuels peuvent ensuite être retrouvés en sommant les différents scans suivant la même matrice de Hadamard. Cette technique a été proposée aussi bien en RMN des solutions <sup>211-213</sup> qu'en RMN en phase solide <sup>214</sup>.

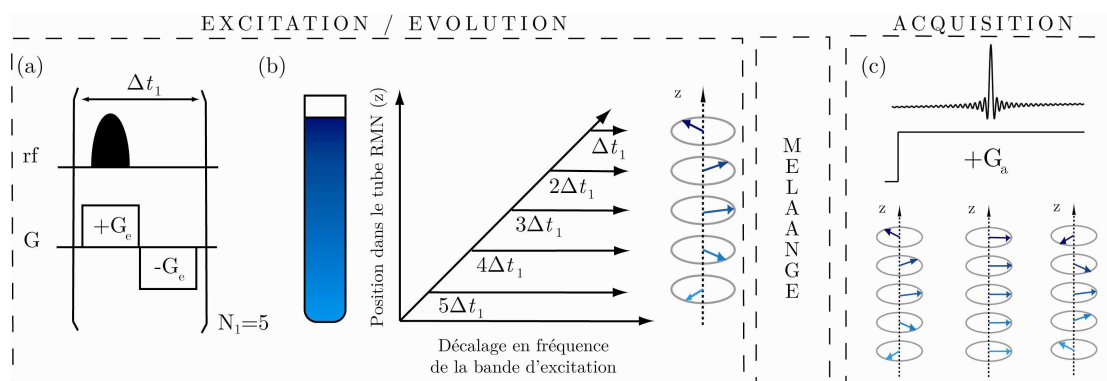
L'avantage de cette technique est que, cette fois, toutes les résonances peuvent être enregistrées en même temps. L'inconvénient est qu'il convient de connaître les déplacements chimiques des résonances avant de pouvoir commencer une expérience de type Hadamard.

#### 4.2.5 Spectroscopie « *ultrafast single-scan* »

Le temps expérimental important consacré à la RMN multidimensionnelle classique provient du fait que les domaines temporels correspondant aux dimensions indirectes sont enregistrés de façon séquentiel en les incrémentant d'une expérience à l'autre. Une ingénieuse approche, inspirée par les techniques d'IRM (ou « Imagerie par Résonance Magnétique ») et contournant ce problème, a été proposée au début des années 2000 par Lucio Frydman<sup>215-218</sup>. Cette technique « *ultrafast* » permet d'enregistrer un spectre multidimensionnel en un unique scan (RMN « *single-scan* »).

La RMN en solution standard manipule généralement de façon homogène les spins contenus dans l'espace défini par le tube RMN et localisés dans la bobine de détection, sans différenciation de localisation au sein de la solution. Dans cette approche, tous les spins évoluent pendant le même temps d'évolution dans les dimensions indirectes. La RMN *ultrafast*, quant à elle, impose que des spins localisés à des endroits différents dans le tube RMN évoluent pendant des temps différents. L'application d'un gradient de champ magnétique permet de créer une distribution inhomogène en fréquences au sein de l'échantillon. La fréquence de résonances des spins dépend donc de leur position au cœur du tube RMN. Les différentes fractions créées par le gradient de champ peuvent être manipulées indépendamment par des impulsions rf sélectives. L'application d'un train d'impulsions sélectives, dont la fréquence est incrémentée d'une impulsion à l'autre, permet de faire rentrer en résonance les spins à des temps différents et de les faire évoluer pendant des délais distincts. Il en découle que les spins contenus dans les différentes fractions vont avoir des phases différentes. L'effet des gradients est ensuite annulé afin que les spins puissent évoluer uniquement sous le déplacement chimique. A la fin de la période d'excitation/évolution, la polarisation des spins peut être représentée comme une hélice tournant le long de l'axe Z du tube RMN. Cette période est suivie par une étape de mélange, comme dans une expérience RMN bidimensionnelle classique, qui ne touche pas aux phases des différentes fractions. L'acquisition est ensuite basée sur une technique utilisée couramment en imagerie IRM, appelée « Echo Planar Imaging ». L'application d'un gradient de champs possédant la même dépendance spatiale que celle utilisée pendant l'excitation permet de dérouler la polarisation et de former un écho, directe-

ment à la fréquence de résonance du spin 1, sans avoir besoin d'une transformation de Fourier (ces différentes étapes sont schématisées sur la Figure 4-5). La formation de cet écho peut être répétée en inversant le signe du gradient de champs de multiple fois. Ceci conduit à la formation de nombreux échos, dont les intensités sont modulées par la fréquence du spin 2 détecté (Cf. Figure 4-6). Une transformation de Fourier de ces points permet d'obtenir la fréquence d'évolution du spin 2 dans la dimension directe, alors que la fréquence d'évolution du spin 1 est déjà connue.



**Figure 4-5.** Principe de la RMN « single-scan ». (a) L'application d'un gradient de champ le long de l'axe Z du tube RMN crée une dépendance spatiale le long du tube. Les différentes fractions (ici au nombre de 5 par souci de simplicité) peuvent être manipulées indépendamment grâce à l'emploi d'un train d'impulsions sélectives. (b) Les spins contenus dans les différentes fractions évoluent pendant des temps d'évolution différents. Ceci conduit à une polarisation ayant la forme d'une hélice tournant le long de l'axe Z du tube. Il s'ensuit une période de mélange conservant les phases de la polarisation. Finalement, l'acquisition du signal est réalisée par l'application d'un gradient de champ conduisant à la formation d'un écho, après un temps déterminé par le déplacement chimique du spin excité en (a). Illustration inspirée de la référence <sup>216</sup>.

Ceci permet de ne plus incrémenter entre chaque scan les différents temps d'évolution dans les différentes dimensions indirectes. Au contraire, les différents incréments sont exécutés en un seul scan et correspondent aux différentes fractions créées au sein de l'échantillon.

Ce principe peut également servir à l'enregistrement de spectres de dimensions supérieures à deux, en utilisant un nombre de gradients égal au nombre de dimensions indirectes, ces gradients ayant des géométries différentes <sup>219</sup>. Cependant, comme cette méthode est techniquement très compliquée à mettre en place, une méthode combinant la RMN ultrafast et la RMN par projection a été développée <sup>218</sup>.

L'avantage majeur de la RMN « single-scan » est qu'elle est la seule à ce jour à pouvoir enregistrer un spectre 2D en un seul scan et donc la seule à avoir accès à des phénomènes biologiques ayant lieu en moins de quelques secondes<sup>220, 221</sup>. Cependant, l'application de cette méthode n'a de sens que pour des systèmes suffisamment sensibles pour donner assez de signal en un seul scan. De plus, cette technique souffre intrinsèquement d'un problème de sensibilité, entre autre causé par l'imperfection des impulsions sélectives. Ces problèmes pourraient être résolus par la combinaison de la RMN « single-scan » avec des méthodes d'hyperpolarisation<sup>222, 223</sup>.

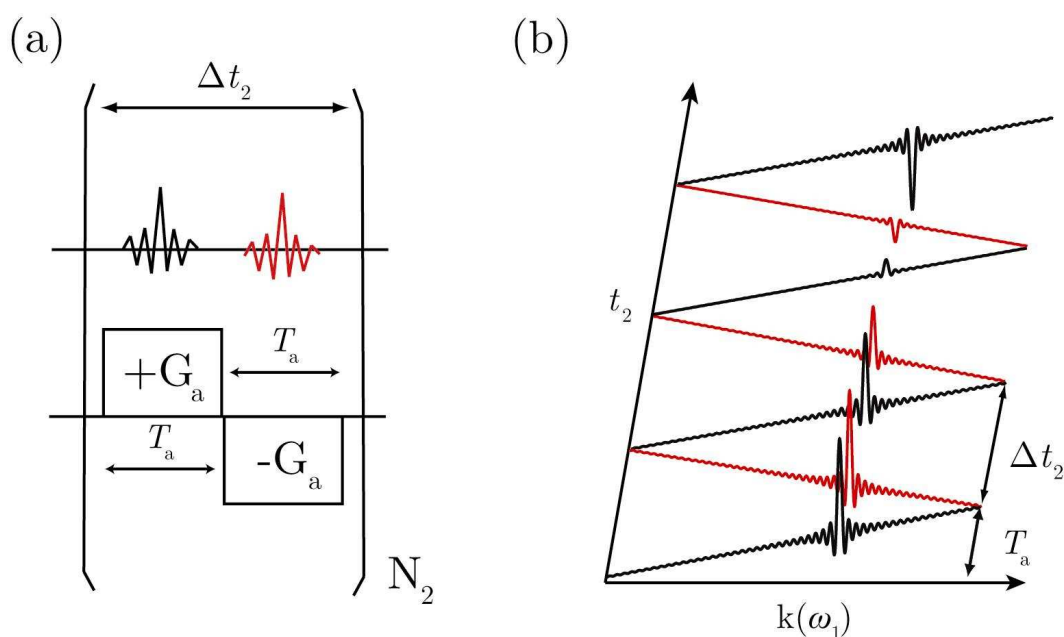


Figure 4-6. Echantillonnage utilisé par la RMN « single-scan ». (a) Le gradient d'acquisition est répété  $N_2$  fois. (b) A chaque répétition, un écho se forme (en noir, quand le gradient est positif, et en rouge quand le gradient est négatif) après un temps déterminé par le déplacement chimique du spin excité 1. Une transformation de Fourier le long de l'axe  $t_2$  permet d'obtenir le déplacement chimique du spin 2. Illustration inspirée de la référence<sup>215</sup>.

La RMN ultrafast a également été implémentée en RMN en phase solide<sup>224</sup>. Dans ce cas, il est nécessaire de disposer d'une sonde possédant des bobines de gradients de champs. Cependant, ce gradient de champ doit être parfaitement aligné avec l'axe de rotation à l'angle magique afin d'éviter toute interférence entre les dépendances temporelles impliquées dans la manipulation des gradients et des spins. Tout comme en solution, cette méthode souffre également d'un gros problème de sensibilité.



### 4.3 Accélération de l'acquisition d'un spectre multidimensionnel : réduction du temps entre chaque scan

Le temps laissé entre chaque scan lors d'une expérience de RMN peut être réduit de façon à diminuer le temps expérimental total, mais bien souvent, ceci conduit à une perte en sensibilité. En effet, en fonction du temps de relaxation des spins considérés, ces derniers peuvent ne pas avoir le temps de récupérer leur aimantation d'équilibre lors du temps inter-scan. Au fur et à mesure des scans, il se met donc en place un phénomène de saturation. Cependant, il existe des méthodes spectroscopiques qui permettent de répéter plus rapidement les expériences sans compromettre leur sensibilité en RMN des solutions ou en phase solide.

#### 4.3.1 RMN en phase liquide

##### 4.3.1.1 Excitation via l'angle de Ernst

Richard Ernst et ses collaborateurs ont réalisé qu'un angle de bascule de 90 degrés ne conduit pas nécessairement à la meilleure sensibilité par unité de temps<sup>225</sup>. Une sensibilité maximale est obtenue quand la formule suivante est respectée :

$$\cos \beta_{Ernst} = \exp\left(-\frac{t_{rec}}{T_1}\right) \quad \text{Equation 4-10}$$

où  $\beta_{Ernst}$  est l'angle de bascule optimal.

Cependant, dans le cas de séquences multidimensionnelles, il est souvent difficile de mettre en place cette méthode, voire même impossible. La séquence HMQC se prête néanmoins très bien à cette technique, ce qui a permis de développer la séquence « fast-HMQC »<sup>182</sup>.

##### 4.3.1.2 Manipulation sélective d'un type de spins

Il existe également des méthodes spectroscopiques qui permettent à l'aimantation de revenir plus rapidement à l'équilibre. Dans le cas des biomolécules, l'amélioration de la relaxation longitudinale des protons a conduit au

développement de nombreuses séquences. Ces techniques se basent sur le phénomène suivant : la récupération de l'aimantation d'un spin peut être sensiblement plus rapide après sa manipulation sélective. Prenons le cas d'une protéine où les protons amides sont sélectivement manipulés. Le retour à l'équilibre de l'aimantation de ces protons se fait de façon bi-exponentielle, alors que le retour à l'équilibre après une manipulation large bande de tous les protons se comporte de façon mono-exponentielle. La première composante de la bi-exponentielle est caractérisée par une constante de temps très courte, ce qui permet à l'aimantation de revenir très rapidement à l'équilibre. Ce phénomène a été attribué à de la relaxation croisée avec les protons aliphatiques. Il a été constaté que l'aimantation des protons aliphatiques s'écarte de l'équilibre à une vitesse comparable à celle de la composante rapide du retour à l'équilibre des protons amides. Ensuite, le retour à l'équilibre de l'aimantation des protons aliphatiques suit la même cinétique que la composante lente du retour à l'équilibre des protons amides. La composante rapide correspond à une rapide redistribution de l'énergie d'excitation via un mécanisme de relaxation croisée. Cette énergie est ensuite évacuée du système grâce aux groupements  $\text{CH}_3$  très mobiles. L'article de revue écrit par Paul Schanda décrit en détails ces mécanismes <sup>178</sup>.

La première séquence exploitant ce phénomène a été développée par Pervushin *et al.* <sup>226</sup>. Les auteurs ont pu mettre en place une séquence de type TROSY, qui utilise les couplages scalaires afin de manipuler sélectivement les différents types de protons. D'autres séquences reposant sur ce phénomène ont également été proposées, mais dans ce cas, la séparation des spins en sous-groupes a été effectuée grâce à l'application d'impulsions sélectives. C'est le cas des séquences flip-back HSQC et BEST par exemple <sup>227, 228</sup>. Enfin, la séquence SOFAST-HMQC combine l'utilisation de l'angle de Ernst avec l'application d'impulsions sélectives sur les protons amides <sup>183, 229</sup>.

Parmi les nombreuses applications de ces méthodes rapides, nous pouvons citer le criblage de ligands se liant à des protéines <sup>182</sup>, la mesure de couplages dipolaires résiduels <sup>230</sup>, le développement de séquences permettant d'attribuer les protéines <sup>231, 232</sup>, l'étude du repliement d'une protéine <sup>233, 234</sup>, l'étude d'assemblage de protéines à haute masse molaire <sup>235</sup>, l'étude de l'ARN <sup>236</sup> etc.

### 4.3.2 RMN en phase solide

En RMN en phase solide, des temps de plusieurs secondes sont souvent nécessaires entre chaque scan afin que (1) la sonde et l'échantillon ne chauffent pas trop durant la durée totale de l'expérience et que (2) l'aimantation

ait le temps de revenir à son état d'équilibre. Cette période d'attente représente jusqu'à 95 % du temps passé sur un spectromètre. Il serait donc dans ce cas particulièrement intéressant de réduire ce délai entre chaque scan. Cependant, il est important de ne pas endommager la sonde et/ou l'échantillon et de conserver une bonne sensibilité. Pour cela, des techniques « basse puissance » ainsi que l'introduction d'ions paramagnétiques et la manipulation sélective de certains spins ont été proposées. Leur application, seule ou combinée, a mené à l'acquisition très rapide de spectres multidimensionnels.

#### 4.3.2.1 Séquences utilisant des blocs à champs rf basse puissance

Afin d'obtenir des spectres haute résolution en RMN en phase solide, il est souvent nécessaire d'appliquer des séquences de découplage utilisant de hautes puissances (de l'ordre de 100 kHz) pendant de longues périodes (de l'ordre de plusieurs dizaines de millisecondes). Une telle irradiation peut provoquer un échauffement de l'échantillon. Ceci est particulièrement vrai pour les échantillons hydratés et contenant de grandes quantités de sels. L'application de ce type de blocs peut également endommager la sonde. Ces raisons ont motivé la recherche de solutions alternatives. Parmi celles-ci, le développement de blocs de découplage « basse puissance » a permis de réduire considérablement la quantité de chaleur apportée à l'échantillon par irradiation, ces blocs pouvant donc être appliqués pendant plus longtemps. Cependant, l'efficacité des blocs de découplage « basse puissance » ne peut concurrencer celle des séquences de découplage « haute puissance » qu'à des vitesses de rotation à l'angle magique supérieures à 40 kHz<sup>237</sup>, régime appelé « ultra-fast MAS »<sup>24, 25</sup>. Ces vitesses de rotation très élevées ont été rendues possibles par l'introduction de rotors ayant un diamètre de l'ordre de 1,3 mm. Différentes séquences de découplage ont été testées dans un régime basse puissance (CW<sup>237, 238</sup>, XiX<sup>239</sup>, TPPM<sup>240</sup>). La polarisation croisée classique nécessitant également des champs rf haute puissance, des variantes de la CP utilisant uniquement des basses puissances ont aussi été développées (« Band-selective CP »<sup>241</sup>, « SOCP »<sup>242</sup>, « MOD-CP »<sup>243</sup>). L'introduction de toutes ces techniques a conduit à la mise en place de séquences utilisant uniquement des blocs « basse puissance »<sup>244, 245</sup>. Récemment, Lyndon Emsley et son équipe ont appliqué ces techniques à une protéine paramagnétique (Cf. paragraphe suivant), ce qui leur a permis de réduire le temps entre chaque scan à 500 ms sans risquer d'endommager la sonde ou l'échantillon tout en augmentant le signal-sur-bruit par unité de temps<sup>246</sup>. Des spectres de corrélation carbone-carbone ont pu être acquis sur moins d'un milligramme d'échantillon en 24 heures, à une vitesse de rotation à l'angle magique de 60 kHz. Il est à noter cependant que

la réduction du temps inter-scan est limitée par la valeur des constantes de temps de relaxation longitudinale des systèmes étudiés.

#### 4.3.2.2 Utilisation d'ions paramagnétiques

Le dopage aux ions paramagnétiques permet de considérablement diminuer les constantes de temps de relaxation. Ce phénomène, mis en évidence par Nicolaas Bloembergen et Pierre-Gilles de Gennes dans des échantillons de cristaux ioniques <sup>7, 8</sup> et appelé PRE pour « Paramagnetic Relaxation Enhancement », permet à la polarisation des atomes concernés de revenir plus rapidement à l'équilibre. Il est donc possible de répéter plus rapidement les expériences de CPMAS (cas des protons) et les expériences d'excitation directe (cas des autres noyaux) et d'augmenter ainsi le signal-sur-bruit par unité de temps de ces expériences.

En 1981, McDowell et son équipe ont étudié l'effet du dopage aux ions paramagnétiques sur le spectre CPMAS de petites molécules organiques. Ils ont pu montrer que l'introduction d'impuretés paramagnétiques, tout en diminuant les constantes de temps de relaxation longitudinale, ne modifie pas le déplacement chimique et n'élargit pas les raies des résonances des molécules étudiées <sup>247</sup>.

L'une des premières utilisations du dopage aux ions paramagnétiques tels que les ions cuivre (II) dans le cas de biopolymères date de 1998 et a permis de réduire les constantes de temps de relaxation des protons lors d'expériences de type CPMAS sur des échantillons de peptides et de protéines étudiés dans des conditions cryogéniques, conditions dans lesquelles les constantes de temps deviennent démesurément importantes <sup>248</sup>.

L'effet du dopage paramagnétique sur la résolution et les constantes de temps de relaxation  $T_1$  des protons n'a été étudié plus profondément par Ishii et ses collaborateurs qu'en 2007 dans le cas d'échantillons de protéines microcristallines à température ambiante <sup>249</sup>. Les auteurs ont montré que la présence d'un agent relaxant, ici un complexe (Cu-EDTA), permet de réduire les constantes de temps de relaxation du proton d'un ordre de grandeur sans que la résolution des spectres ne soit affectée. Les auteurs montrent qu'en utilisant une vitesse de rotation à l'angle magique de 40 kHz et un découplage hétéro-nucléaire constitué d'un train d'impulsions  $\pi$  moins demandant en puissance qu'un découplage de type TPPM, il est possible de réduire le temps inter-scan d'une expérience monodimensionnelle à 180 ms. La sensibilité de l'expérience CPMAS est augmentée d'un facteur  $\approx 3$ , ce qui permet d'augmenter la vitesse d'acquisition des spectres par un facteur 8.

En 2007, et plus précisément en 2009, Ishii et ses collaborateurs ont proposé un mécanisme permettant d'expliquer comment la polarisation revient à l'équilibre plus rapidement dans le cas de protéines hydratées microcristallines<sup>249, 250</sup>. Ces échantillons contenant une grande quantité d'eau et le complexe (Cu-EDTA) étant hydrophile, ce dernier peut atteindre la surface de la protéine par diffusion. Les protons à la surface de la protéine voient alors leur constante de temps de relaxation diminuer. La polarisation que les protons de surface viennent de récupérer peut ensuite être transférée aux protons localisés au cœur de la protéine par un mécanisme de diffusion de spin.

Bernd Reif et ses collaborateurs ont démontré en 2007 qu'il est possible de doper de la même manière des échantillons de protéines deutérées<sup>251</sup>. Cette deutération leur a permis d'enregistrer des spectres de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  en l'absence de découplage hétéronucléaire, ce qui permet de réduire le temps entre chaque scan sans risquer d'abimer la sonde. Ceci a également pour avantage de limiter l'échauffement de l'échantillon et donc de le préserver. L'introduction de l'agent dopant leur a permis de réduire le temps entre chaque scan par un facteur 15.

En 2010, cette même stratégie de dopage à des agents relaxants a été introduite à l'étude de protéines membranaires : le cuivre chélaté à l'EDTA est introduit dans une bicouche lipidique contenant la protéine étudiée<sup>252</sup>.

Cette méthode PRE utilisée en combinaison avec de hautes vitesses de rotation à l'angle magique, et donc des techniques de découplage basse puissance (Cf. le paragraphe précédent) a été présentée et nommée PACC, pour « Paramagnetic relaxation-Assisted Condensed data Collection », par Ishii et ses collaborateurs<sup>250</sup>. Ceci leur a permis d'accélérer l'acquisition de leurs données par un facteur 20 et d'enregistrer des spectres bidimensionnels sur des échantillons de fibrilles  $\beta$ -amyloïdes en une journée.

Enfin, il y a quelques mois, Christopher Jaroniec et son équipe ont proposé une combinaison (1) des techniques à très hautes vitesses et donc basse puissance avec (2) l'utilisation d'étiquettes paramagnétiques liées de façon covalente aux protéines étudiées.

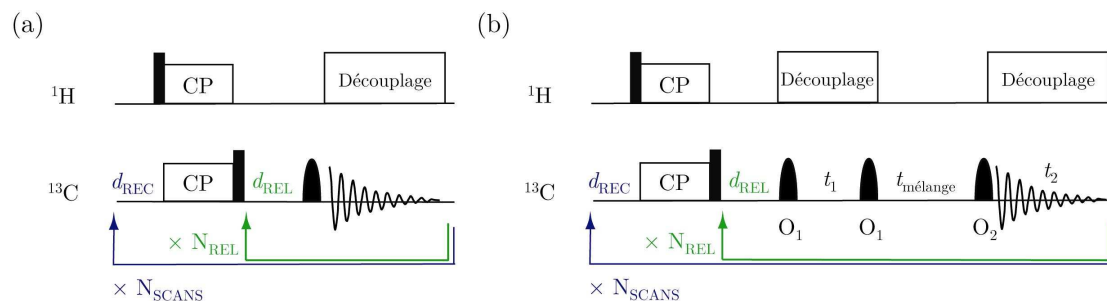
#### 4.3.2.3 Utilisation d'impulsions sélectives

Récemment, Glaubitz et ses collaborateurs ont proposé une méthode utilisant une manipulation sélective de certains carbones au sein d'un échantillon uniformément marqué<sup>253</sup>. Cette manipulation permet à l'aimantation des spins sélectivement excités de revenir plus rapidement à l'équilibre par un mécanisme de diffusion de spin (PDSD). Ceci permet de réduire le délai entre chaque scan et donc d'augmenter la vitesse d'acquisition des données. Cette

méthode se rapproche des techniques de type BEST en RMN des solutions. Le mécanisme de retour à l'équilibre a été baptisé RELOAD, pour « Relaxation Enhancement by a Lower temperature of ADjacent spins ».

Les auteurs ont mesuré les constantes de temps de relaxation du carbone par inversion-récupération lors de l'utilisation d'une impulsion large bande ou d'une impulsion sélective. Ils ont pu constater une diminution de ces constantes par un facteur 100 dans le deuxième cas. Ils ont en effet enregistré des constantes de temps d'environ 10 ms après application d'une impulsion sélective.

L'effet RELOAD a été implémenté dans une expérience 1D de type CPMAS : une étape de polarisation croisée est utilisée pour augmenter la polarisation des atomes de carbones. Cette étape est suivie par une impulsion de 90 degrés sur la voie carbone permettant de stocker l'aimantation des carbones le long de Z. Enfin, une impulsion sélective de 90 degrés est appliquée avant l'acquisition du signal. Un délai  $d_{\text{REL}}$ , de l'ordre de quelques centaines de millisecondes, pendant lequel il n'y a pas de découplage est introduit afin de permettre à l'aimantation du spin sélectivement excité de revenir plus rapidement à l'équilibre par PDSD.  $N_{\text{REL}}$  scans sont enregistrés avant qu'un nouveau délai  $d_{\text{REC}}$ , de l'ordre de la seconde, soit introduit afin de limiter les effets d'échauffement dus au découplage (Cf. Figure 4-7).



**Figure 4-7. Séquences (a) 1D CPMAS et (b) 2D PDSD modifiées de façon à intégrer l'effet RELOAD.**

L'effet RELOAD a également été introduit dans une séquence de type PDSD et a permis l'enregistrement de spectres 2D (corrélation CO-CO,  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$  et CO- $C_{\alpha}$ ) sur le tripeptide MLF en 3 heures au lieu des 36 qui auraient été nécessaires à l'enregistrement du spectre à large fenêtre spectrale sans l'utilisation d'impulsions sélectives.

Afin de trouver une solution au problème de sensibilité rencontré en RMN en phase solide, nous nous sommes également intéressés à la façon dont l'application d'impulsions sélectives sur les carbones peut significativement

accélérer le retour à l'équilibre de l'aimantation dans des échantillons complètement marqués. Notre étude de ce phénomène, réalisée en parallèle de celle de Glaubitz, est relatée et comparée à la méthode RELOAD dans le chapitre suivant.

## Chapitre 5

---

Impact des impulsions sélectives sur le retour à l'équilibre de l'aimantation des carbones en RMN en phase solide





## 5. Impact des impulsions sélectives sur le retour à l'équilibre de l'aimantation des carbones en RMN en phase solide

Dans ce chapitre, nous étudions l'effet de la manipulation sélective des atomes de carbone sur leur retour à l'équilibre dans des échantillons uniformément marqués. Le fait de choisir de manipuler sélectivement ces atomes au lieu des protons a été motivé par deux aspects. Tout d'abord, les couplages dipolaires importants entre les protons rend l'utilisation d'impulsions sélectives impossible en RMN en phase solide, sauf peut être quand l'expérimentateur a à sa disposition des sondes « ultrafast », permettant une vitesse de rotation à l'angle magique de l'ordre de 60 kHz. De plus, dans le cas de peptides ou protéines complètement marqués en carbone 13, le nombre de protons par atome de carbone n'est pas suffisamment important pour atteindre le gain en sensibilité théorique maximal apportée par la polarisation croisée<sup>254, 255</sup>. Dans de tels échantillons, le gain maximal apporté par la CP n'est que de 2,4 environ. L'accélération du retour à l'équilibre de l'aimantation des carbones peut donc rendre les méthodes d'excitation directe compétitives par rapport aux méthodes CPMAS.

### 5.1 Cas d'une molécule modèle : l'histidine

#### 5.1.1 Préparation et attribution de l'histidine

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à une molécule modèle : l'histidine complètement marquée. Les atomes de cet échantillon possédant des constantes de temps de relaxation très longues, nous avons commencé par le doper aux ions Cu(II). Pour cela, la L-histidine uniformément enrichie en carbone 13 et azote 15, achetée chez Cambridge Isotope Laboratories, a été recristallisée dans une solution de CuCl<sub>2</sub> à 0,9 mM. Après cristallisation, un mélange de deux formes cristallines a été obtenu dans des proportions différentes. Ces deux formes seront appelées formes A et B de l'histidine dans la suite de ce chapitre. Afin d'attribuer les résonances de ces deux formes cristallines, nous avons enregistré un spectre de résonance du carbone par polarisation croisée (Cf. Figure 5-1).

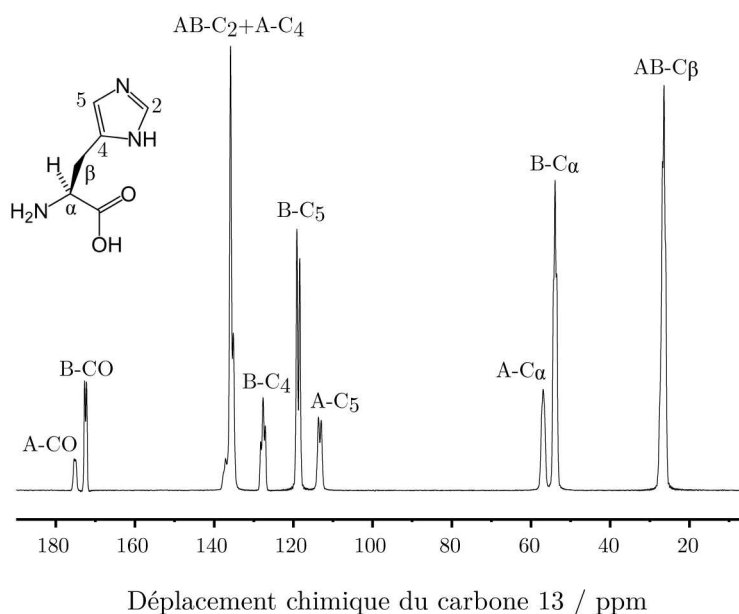
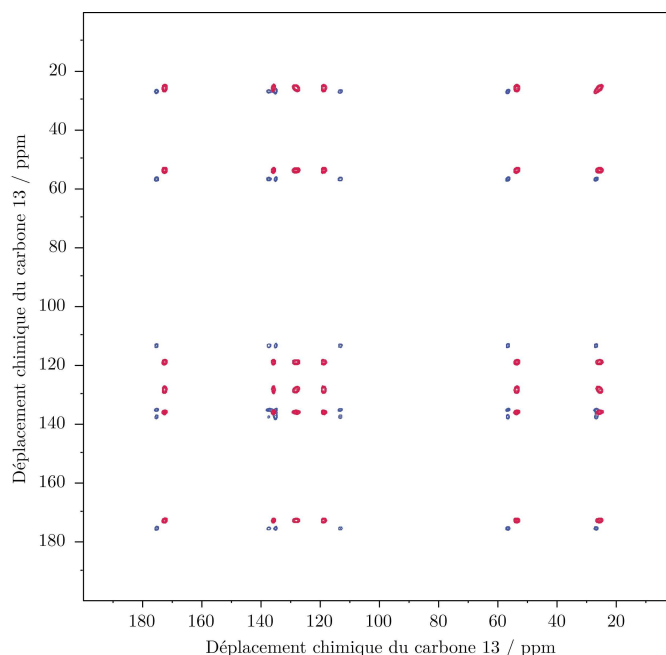


Figure 5-1. Spectre 1D de résonance du carbone de l'acide aminé  $[U-^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -histidine. La nomenclature IUPAC a été utilisée pour la numérotation des carbones de la molécule. Les deux formes cristallines présentes dans l'échantillon ont été arbitrairement appelées A et B. Le spectre a été enregistré sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 2,5 mm avec  $\omega_{\text{H}}/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_{\text{r}}/2\pi = 30$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 293 K (gaz « bearing » à 268 K). Le temps d'acquisition était de 45 ms. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée caractérisée par un temps de contact de 1 ms et par une force de champ rf moyen sur la voie proton de 90 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Une rampe de puissance a été appliquée sur le canal proton <sup>256</sup>. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 150 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. 80 scans ont été accumulés. Le temps entre chaque scan était de 5 s.

Nous avons également enregistré des spectres de corrélation carbone-carbone de type PDSD. Ces expériences nous ont permis de différencier de manière incontestable les systèmes de spins de la forme A et de la forme B (Cf. Figure 5-2). En effet, lors d'une expérience PDSD, l'aimantation initialement acquise par les spins lors de la phase d'excitation est distribuée pendant la période de mélange. A vitesse de rotation à l'angle magique modérée, si le temps de mélange est court, l'aimantation sera distribuée uniquement aux plus proches voisins. En revanche, si le temps de mélange est long, comme dans notre exemple, l'aimantation pourra être distribuée à tous les spins de la molécule, même ceux situés les plus loin. L'aimantation sera cependant beaucoup plus difficilement distribuée à des spins appartenant à une autre molé-

cule, et donc à une molécule possédant une autre forme cristalline, les distances entre les spins devenant trop importantes pour qu'un recouplage efficace ait lieu entre eux. Sur le spectre 2D, le système de spins de la forme A est représenté en bleu et celui de la forme B en rouge.



**Figure 5-2.** Spectre de corrélation carbone-carbone de type PDSO de l'acide aminé  $[U-^{13}C, ^{15}N]$ -histidine. Les pics correspondants à la forme A sont en bleu et ceux correspondants à la forme B sont en rouge. Le spectre a été mesuré sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 4 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 9$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 293 K (gaz « bearing » à 283 K). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par un temps de contact de 1000  $\mu$ s, une force de champ rf moyen sur la voie proton de 61 kHz et sur la voie carbone de 52 kHz. Une rampe de puissance a été appliquée sur le canal proton <sup>256</sup>. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 52 kHz également. Pendant l'évolution et l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 57 kHz. La fenêtre spectrale était de 30 kHz dans la dimension directe et de 22 kHz dans la dimension indirecte. Le temps de mélange PDSO était de 100 ms. Les temps d'acquisition étaient de 30 ms dans la dimension directe et de 20 ms dans la dimension indirecte. 8 scans ont été accumulés après 4 « dummy » scans. Une détection quadrature de type States-TPPI a été utilisée <sup>128</sup>. Le temps entre deux scans était de 4,8 s, conduisant à un temps expérimental total de 10 h. Une fenêtre d'apodisation de type exponentielle de 0,3 Hz a été appliquée dans la dimension indirecte.

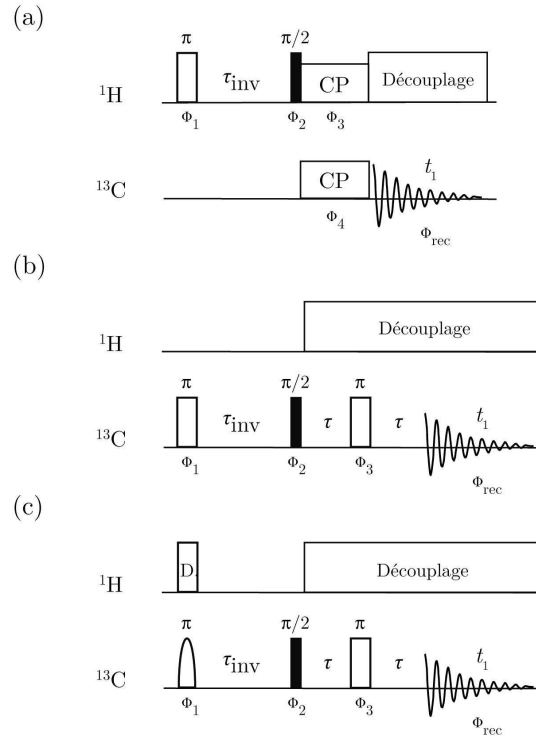
L'attribution des formes de l'histidine est donnée dans la Table 5-1. L'identification des deux histidines A et B reste encore quelque peu mystérieuse. Nous avons proposé que ces deux formes de l'acide aminé obtenues soient deux formes cristallines différentes pendant l'étape de recristallisation, ce qui pourrait expliquer leur proportion différente. Les déplacements chimiques que nous avons enregistrés correspondent à ceux référencés par Kimura *et al.* pour la forme A <sup>257</sup> et Ye *et al.* pour la forme B <sup>175</sup>. Cependant, Piotr Tekely, lors de la publication de notre article, nous a fait part de son opinion : selon lui, les deux formes de l'histidine que nous observons correspondent à deux formes différemment protonées LH2 (notre forme B) et LH (notre forme A) de l'histidine. Piotr Tekely a appuyé son argumentation sur l'un de ses articles où il avait étudié les différentes formes acido-basiques de l'histidine <sup>258</sup>. La différence de déplacements chimiques observée entre ceux que nous avons recensés et ceux indiqués dans sa publication pourrait s'expliquer par le caractère amorphe de ses échantillons et par le caractère cristallin du nôtre. Ce point de vue est très intéressant et remet en question notre supposition. Nous n'avons pas eu l'occasion de procéder à d'autres expériences afin de déterminer la véritable nature de ces formes distinctes de l'histidine, ce qui est regrettable. Cependant, nous ne pensons pas que cela ait un impact sur les interprétations de nos données à suivre dans ce chapitre. En effet, le retour de l'aimantation après une impulsion sélective est comparé au retour de l'aimantation après une manipulation large-bande des spins de la même espèce.

	Déplacements chimiques du carbone 13 / ppm					
	C=O	C <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>α</sub>	C <sub>β</sub>
Histidine-A	175,2	135,2	137,2	113,3	57,0	26,5
Histidine-B	172,5	135,9	127,7	118,8	53,9	26,5

**Table 5-1.** Valeurs expérimentales des déplacements chimiques des résonances du carbone 13 des formes A et B de l'histidine. Les valeurs des déplacements chimiques sont calibrées indirectement en utilisant la résonance du carbonyle de la glycine référencée à 176,45 ppm par rapport au SDS.

### 5.1.2 Mesure des constantes de temps de relaxation non-sélectives à basse vitesse de rotation à l'angle magique

Dans le cas d'échantillons uniformément marqués, la relaxation longitudinale de l'aimantation des protons et des carbones n'est pas seulement dictée par la modulation incohérente des interactions anisotropes causées par la dynamique moléculaire mais aussi par des mécanismes déterministes à multiples spins tels que la diffusion de spin. Nous proposons donc d'appeler les constantes de temps de relaxation apparentes  $T_1^*$ , en analogie au  $T_2^*$  utilisé en RMN en phase solide pour décrire la décroissance de l'induction libre (ou FID) apparente. Nous préférons réserver la nomenclature  $T_1$  pour la relaxation induite uniquement par la dynamique moléculaire.



**Figure 5-3.** Séquences d'impulsions permettant de mesurer par des méthodes d'inversion-récupération (a) les constantes de temps  $T_{1H}^*$ , ainsi que les constantes  $T_{1C}^*$  (b) non-sélectives et (c) sélectives. Les impulsions de 90 et 180 degrés sont représentées respectivement par les barres verticales noires et blanches. Les cycles de phase utilisés sont les suivants : (a)  $\Phi_1 = x, -x$  ;  $\Phi_2 = y, y, -y, -y$  ;  $\Phi_3 = x$  ;  $\Phi_4 = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, x, -x, -x, -x, -x, x, x, y, y, -y, -y, -y, -y, y, y$ . (b) et (c)  $\Phi_1 = x, -x$  ;  $\Phi_2 = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$  ;  $\Phi_3 = x, x, -x, -x, -x, -x, x, x, y, y, -y, -y, -y, -y, y, y$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$ .

Dans le cas de l'histidine, nous avons dans un premier temps mesuré les constantes de temps de relaxation longitudinale apparentes non sélectives des protons  $T_{1H}^*$  et des carbones  $T_{1C}^*$  à 9 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique. Les constantes de temps  $T_{1H}^*$  ont été mesurées indirectement via les carbones. La séquence commence par une inversion des spins des protons, suivie par un délai  $\tau_{inv}$  pendant lequel les spins reviennent à leur état d'équilibre librement. L'aimantation persistant à la fin de ce délai est détectée via une étape de CP classique (Cf. Figure 5-3 (a)). Les constantes de temps  $T_{1C}^*$  sont mesurées grâce à une séquence d'inversion-récupération où les carbones sont tout d'abord inversés puis laissés librement revenir à l'équilibre. L'aimantation résultante est détectée par une impulsion de 90 degrés. Un écho de type  $\tau$ - $\pi$ - $\tau$ , où le délai  $\tau$  est égal à une période de rotation en présence de découplage a été ajouté avant la détection de façon à éliminer le signal résiduel de la sonde (Cf. Figure 5-3 (b)). La séquence d'inversion-récupération est préférée à la méthode de Torchia<sup>259</sup>, qui permet d'enregistrer des courbes de décroissance exponentielle. Dans le cas d'une polarisation non-uniforme des différents atomes de carbones après l'étape de CP, le début des courbes de décroissance mesurées par la méthode de Torchia est perturbé par des effets de diffusion de spins.

Les constantes de temps de relaxation  $T_{1H}^*$  et  $T_{1C}^*$  ont pu être extraites des courbes d'inversion-récupération en ajustant les aires ou les intensités du signal en fonction du temps de récupération grâce au logiciel Origin7.5 et à l'équation suivante :

$$I(t) = I_0 \left( 1 - A \sum_{n=1}^i B_n \exp \left\{ -\frac{t}{T_{1,n}^*} \right\} \right) \quad \text{Equation 5-1}$$

où  $A$  est le facteur de qualité de l'inversion, qui doit être proche de 2 et  $B_n$  le coefficient normalisé des différentes composantes exponentielles ( $\sum B_n = 1$ ). Dans le cas des expériences non-sélectives, toutes les courbes de relaxation ont pu être ajustées avec une équation mono-exponentielle ( $i=1$ ) sauf dans le cas des résonances d'un aromatique et des carbones  $C_\beta$ , qui sont une superposition de pics correspondant aux deux formes cristallines (Cf. Figure 5-4, courbes bleue et verte).

Comme la diffusion de spin entre les protons mais aussi entre les carbones moyenne les temps de relaxation au sein de la molécule, les constantes de temps de relaxation  $T_{1H}^*$  et  $T_{1C}^*$  sont très similaires pour des noyaux appartenant à la même forme cristalline de l'histidine. Nous avons pu constater que

les constantes de temps de relaxation apparentes sont plus petites pour la forme A. Elles sont de 0,7 s et 30 s pour  $T_{1H}^*$  et  $T_{1C}^*$ , respectivement. Celles de la forme B sont de 3,6 s et 84 s. Il est possible que cette différence provienne du fait que les ions paramagnétiques  $\text{Cu}^{2+}$  co-cristallisent uniquement avec la forme A. Ceci pourrait également expliquer pourquoi la résolution des résonances de la forme A est un petit peu moins bonne que celle des résonances de la forme B (Cf. Figure 5-1). Au vu de la différence de plus d'un ordre de grandeur entre les constantes de temps de relaxation des protons et des carbones, il semble évident que la polarisation croisée, en plus du gain en sensibilité inhérent à cette technique, est beaucoup plus efficace que l'excitation directe large bande des carbones dans le cas d'un solide rigide, puisqu'il est possible en utilisant cette première technique de répéter plus souvent l'expérience sans compromettre sa sensibilité.

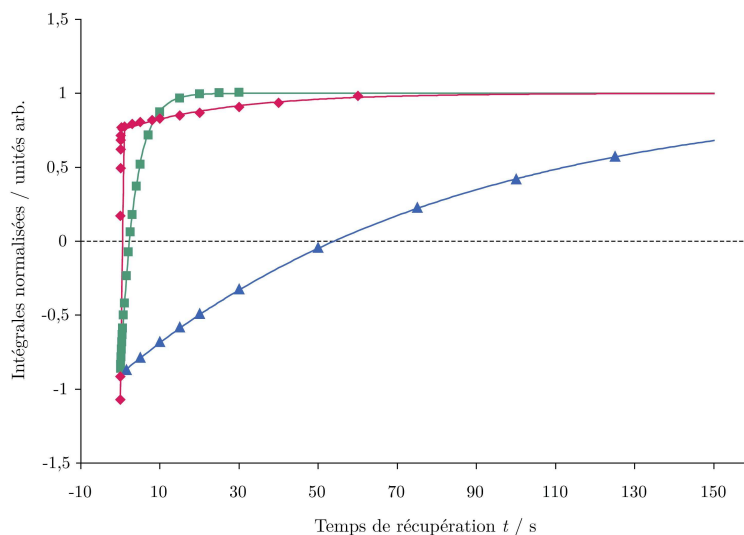


Figure 5-4. Courbes de récupération de l'aimantation après inversion de l'aimantation des protons de la forme B (carré vert), des carbones de la forme B de façon non-sélective (triangles bleus) et du CO de la forme B de façon sélective (losanges roses) à 9 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique. Les courbes sont des ajustements des données expérimentales par une fonction mono- (courbes bleue et verte) ou bi-exponentielle (courbe rose) de l'équation 5-1. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. L'impulsion sélective, de type Iburp-1, a été créée de façon à n'exciter que les résonances des carbonyles (dans ce cas). Sa durée était de 4500  $\mu\text{s}$ . 8 scans ont été accumulés après 8 « dummy » scans. Le temps entre chaque scan a été calculé de façon à valoir entre 5 et 7 fois la valeur de la composante lente des constantes de relaxation sélectives, soit 25 s dans le cas des expériences commençant par une étape de CPMAS, 450 s dans le cas des expériences non-sélectives et 300 s dans le cas des expériences sélectives.



### 5.1.3 Mesure des constantes de temps de relaxation sélectives à basse vitesse de rotation à l'angle magique

Nous avons pu remarquer que l'inversion sélective de l'aimantation de l'un des carbones de l'histidine entraîne un comportement complètement différent de la relaxation longitudinale. La courbe de récupération d'aimantation après inversion sélective de la résonance du carboxyle de la forme B est représentée en Figure 5-4 (courbe rose) et en Figure 5-5 (a). Le même comportement a pu être observé pour toutes les autres résonances de l'histidine après avoir été sélectivement inversées (Cf. Equation 5-1, où  $i=2$ ). Le retour à l'équilibre après inversion sélective a lieu nettement de façon bi-exponentielle. La composante rapide est de l'ordre de 1 à 20 ms, selon la résonance qui est inversée (les valeurs exactes sont données dans la Table 5-2).

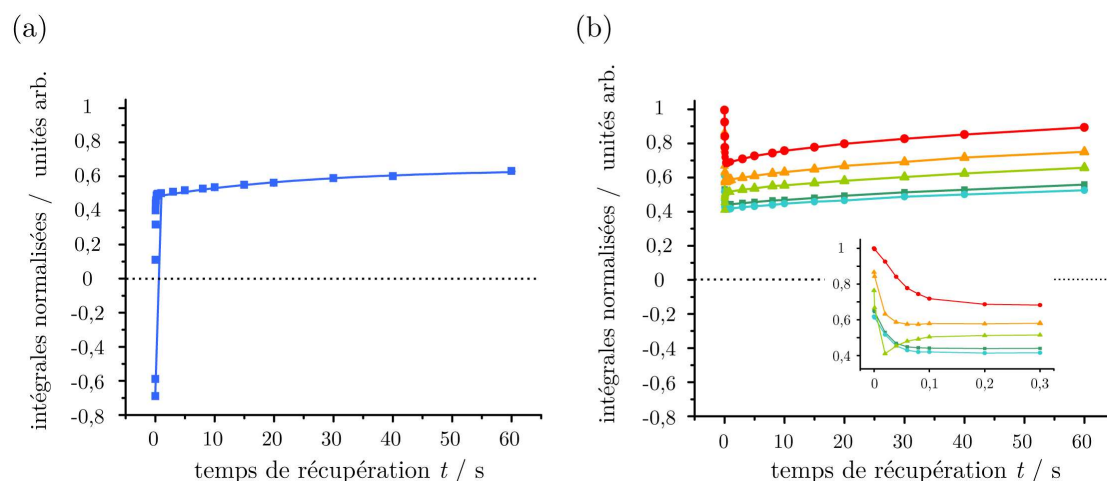
	A-CO	B-CO	B-C <sub>4</sub>	B-C <sub>5</sub>	A-C <sub>α</sub>	B-C <sub>α</sub>	AB-C <sub>β</sub>
9 kHz MAS	20,9	19,1	1,5	2,2	8,1	6,6	2,7
30 kHz MAS	3936	11 007	34,2	41,0	63,1	41,4	46,6

**Table 5-2.** Composantes rapides  $T_{1c}^*$  en ms pour les différentes résonances de l'histidine.

Cette composante est très importante puisqu'elle permet de ramener à l'équilibre entre 70 et 80 pourcent de l'aimantation. Le mécanisme permettant cette récupération rapide de l'aimantation est attribué à la diffusion de spin entre carbones utilisant les protons (ou zero-quantum Proton-Driven Spin-Diffusion, PDSD). En effet, si seulement l'un des spins est inversé, une différence de polarisation est créée entre le spin inversé et ses voisins. Pendant le temps de récupération, la diffusion de spin va permettre de rééquilibrer l'aimantation parmi tous les spins de carbone avant qu'ils ne relaxent ensemble jusqu'à l'équilibre. Cet effet a déjà pu être observé il y a quelques années dans le cas de polymères en abondance naturelle <sup>260</sup>. La rééquilibration de l'aimantation est également visible pour les résonances non inversées de l'histidine, qui présentent toutes une diminution rapide de leur aimantation longitudinale avant de retourner à l'équilibre (Cf. Figure 5-5 (b)). Le temps pendant lequel cette diminution a lieu est environ le même que celui pendant lequel l'aimantation du spin inversé revient très rapidement à l'équilibre (grâce à la composante rapide). Ce temps correspond aussi au temps de mon-

tée en polarisation des pics de corrélation observables sur un spectre PDSO carbone-carbone en deux dimensions. La thèse du retour à l'équilibre plus rapide via un mécanisme de PDSO est également étayée par le fait que la manipulation d'un spin de la forme A n'entraîne aucune modification de l'aimantation des spins de la forme B.

Les valeurs de la composante la plus lente obtenues après inversion sélective sont comparées aux constantes de temps  $T_{IC}^*$  non-sélectives pour les différentes résonances de l'histidine sur la Figure 5-6 (a). Les données montrent que même la composante lente est significativement plus rapide que les constantes de temps non-sélectives, et ce pour toutes les résonances. Elle reste cependant plus lente que les constantes de temps de relaxation du proton (Cf. Figure 5-6 (a)). Cet aspect est discuté un peu plus loin.



**Figure 5-5.** Courbes de récupération de l'aimantation après inversion sélective de la résonance du carboxyle de la forme B de l'histidine à 9 kHz MAS. Evolution du signal (a) de la résonance du carboxyle inversée (carrés bleus) et (b) du  $C_\alpha$  (triangles vert clair), du  $C_\beta$  (triangles oranges), du  $C_4$  (carrés vert foncé), du  $C_5$  (cercles bleu-vert) et du  $C_2$  (cercles rouges) de la forme B. Sur la figure (a), la courbe est un ajustement par la fonction bi-exponentielle de l'équation 5-1 des données expérimentales. Dans le cas de (b), l'encart est un zoom des courbes pour des temps de récupération très courts. Dans ce cas, les courbes sont des interpolations des points expérimentaux. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-4.

#### 5.1.4 Mesure du signal sur bruit par unité de temps à basse vitesse de rotation à l'angle magique

Afin d'estimer si les expériences basées sur une excitation sélective des carbones peuvent concurrencer celles basées sur la polarisation croisée, les courbes théoriques de signal sur bruit par unité de temps ont été calculées en utilisant l'équation suivante <sup>229</sup>:

$$\left(\frac{S}{N}\right)_t = \eta \times \frac{1 - \sum_n^i B_n \exp\left\{-\frac{t_{rec}}{T_{1,n}^*}\right\}}{\sqrt{T_{scan}}} \quad \text{Equation 5-2}$$

pour les expériences de polarisation croisée, d'excitation directe du carbone large bande et sélective. Comme défini dans le chapitre précédent,  $T_{scan}$  est le temps total nécessaire à la réalisation d'un scan et  $t_{rec}$  est le délai pendant lequel les spins peuvent récupérer leur aimantation. Dans le cas d'expériences non-sélectives,  $t_{rec}$  est donc la somme du délai entre chaque scan et du temps d'acquisition. Dans le cas d'expériences sélectives, deux composantes contribuent à la relaxation, comme nous venons de le voir. La composante rapide, qui est attribuée à la diffusion de spins, ne devient active qu'en l'absence de découplage. Dans ce cas, seul le temps entre chaque scan est pris en compte dans  $t_{rec}$ . Pour la composante lente,  $t_{rec}$  est défini de la même manière que dans le cas d'expériences non-sélectives.  $B_n$  est le coefficient normalisé tiré de l'équation 5-1. Le facteur de gain  $\eta$  prend en compte l'augmentation en sensibilité apportée par la CP par rapport à des expériences d'excitation directe. Ce facteur est donc fixé à 1 dans le cas d'expériences d'excitation directe et peut atteindre 2,4 dans le cas d'expériences CPMAS appliquées sur des échantillons d'acides aminés ou de protéines complètement marqués <sup>254, 255</sup>. Dans chaque cas,  $\eta$  est ajusté en fonction des points expérimentaux.

Ces courbes théoriques du signal sur bruit par unité de temps sont visibles sur la Figure 5-6 (b) et (c) dans le cas des résonances du carboxyle et du  $C_\alpha$  de la forme B de l'histidine, respectivement, ainsi que les différents points expérimentaux enregistrés. Ces points expérimentaux suivent parfaitement les courbes calculées dans le cas des expériences de polarisation croisée et d'excitation directe large bande. Dans le cas des expériences utilisant des excitations sélectives, la sensibilité maximale théorique devrait être obtenue pour des délais inter-scan très courts ( $T_{scan} < 1$  s). Cependant, cela n'a pu être véri-

fié expérimentalement que lorsque peu de scans ont été accumulés. Les points expérimentaux correspondants sont représentés par des croix (×) sur la Figure 5-6 (b) et (c) et ont été enregistrés après 2 « dummy » scans et 2 scans seulement. Quand plus de « dummy » scans ont été utilisés afin d'atteindre un état de quasi-équilibre, la sensibilité s'est révélée bien moindre pour des délais inter-scans très courts. Les points expérimentaux correspondants sont représentés par des signes plus (+) sur la Figure 5-6 (b) et (c) et ont été enregistrés après 32 dummy scans. Cette perte de sensibilité est le résultat de la lente dé-polarisation des spins de carbone non excités. Ils seront appelés par la suite « bain de carbones ». En effet, pendant le premier scan, une partie de la polarisation des spins à l'équilibre est transférée au spin excité, ce qui permet une récupération plus rapide de son aimantation. Quand le temps entre deux scans est plus court que le temps nécessaire aux spins non-excités pour revenir à l'équilibre, une dépolarisation du bain de carbones est observée lors des scans suivants. La contribution de la diffusion de spin à la relaxation longitudinale est en conséquence amoindrie et donc la sensibilité de l'expérience réduite. Il en découle que, dans le cas où la valeur de la vitesse de rotation à l'angle magique est plutôt faible, les expériences basées sur des excitations sélectives ne peuvent concurrencer les expériences de polarisation croisée que pour des temps inter-scans très courts et uniquement si le bain de carbones non-excités est assez important et relaxe à une échelle de temps comparable à celle du temps de répétition de l'expérience.

Cependant, il n'est pour le moment possible de répéter très rapidement les expériences sans endommager la sonde ou l'échantillon qu'en utilisant des séquences « basse puissance », qui vont de paire avec de très hautes vitesses de rotation à l'angle magique. Comme nous n'avons pas l'équipement spécifique, nous avons commencé par répéter les expériences d'inversion-récupération à une vitesse de rotation à l'angle magique de 30 kHz.

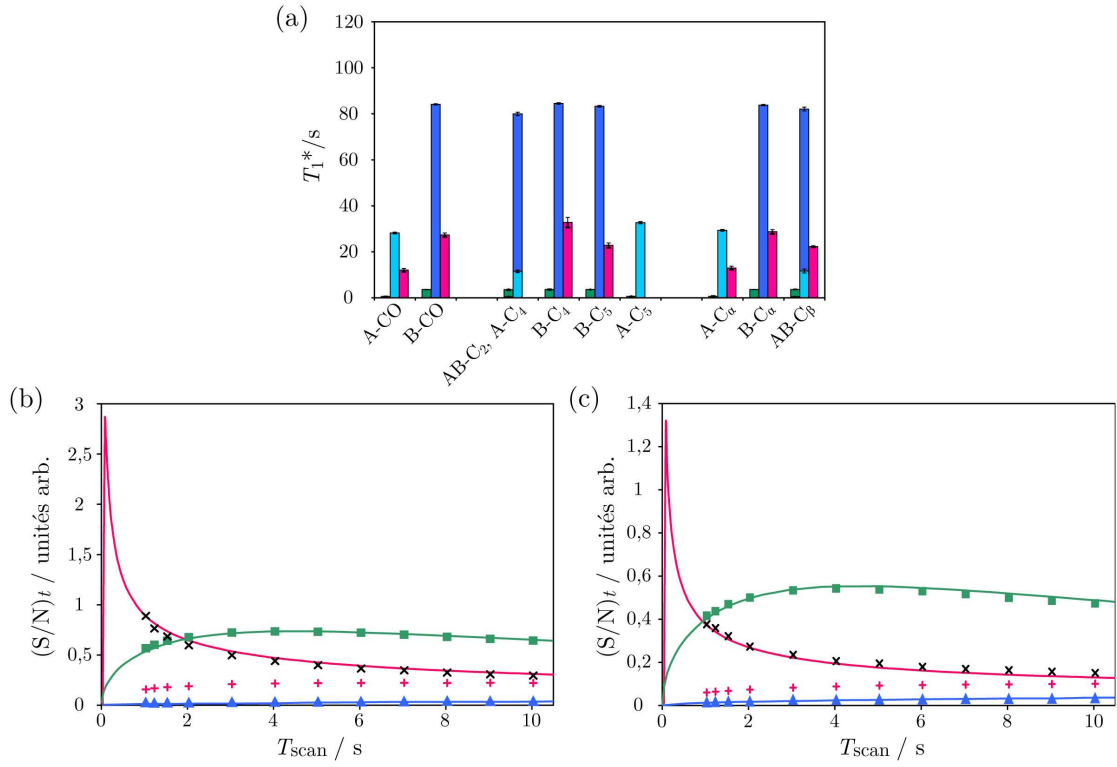


Figure 5-6. (a) Constantes de temps de relaxation longitudinales apparentes  $T_1^*$  mesurées sur l'histidine par inversion-récupération à 9 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique après une étape de polarisation croisée ( $T_{1H}^*$ , barres vertes), après excitation directe large bande ( $T_{1C}^*$ , barres bleu clair et bleu foncé pour les formes A et B de l'histidine, respectivement) et après excitation sélective ( $T_{1C}^*$ , barres rouges). Dans le cas des  $T_{1C}^*$  sélectifs, seule la composante longue de la courbe bi-exponentielle est représentée. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard lors de la détermination expérimentale des constantes de temps. (b) et (c) Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculé et expérimental en fonction du temps  $T_{scan}$  consacré à chaque scan pour (b) la résonance du carboxyle et (c) la résonance du  $C_\alpha$  de la forme B de l'histidine à 9 kHz de vitesse de rotation. Les lignes pleines représentent les courbes numériques calculées grâce à l'équation 5-2 en utilisant les valeurs expérimentales de  $T_1^*$  données dans la Table 5-2 pour les expériences de polarisation croisée (vert), d'excitation directe large bande (bleu), et d'excitation sélective (rouge). Le facteur de gain apporté par la polarisation croisée  $\eta$  est choisi de façon à ajuster au mieux les points expérimentaux. Il est de 2,2 sur le graphe (b) et de 1,65 sur le graphe (c). Les courbes théoriques sont comparées aux points expérimentaux enregistrés par polarisation croisée (carrés verts), excitation directe large bande (triangles bleus) et excitation sélective (croix noires et signes plus rouges). Pour chaque point expérimental, 8 scans précédés de 32 dummy scans ont été accumulés, sauf pour les valeurs expérimentales représentées par une croix noire où seulement 2 scans après 2 dummy scans ont été enregistrés. Les expériences ont été enregistrées dans les mêmes conditions

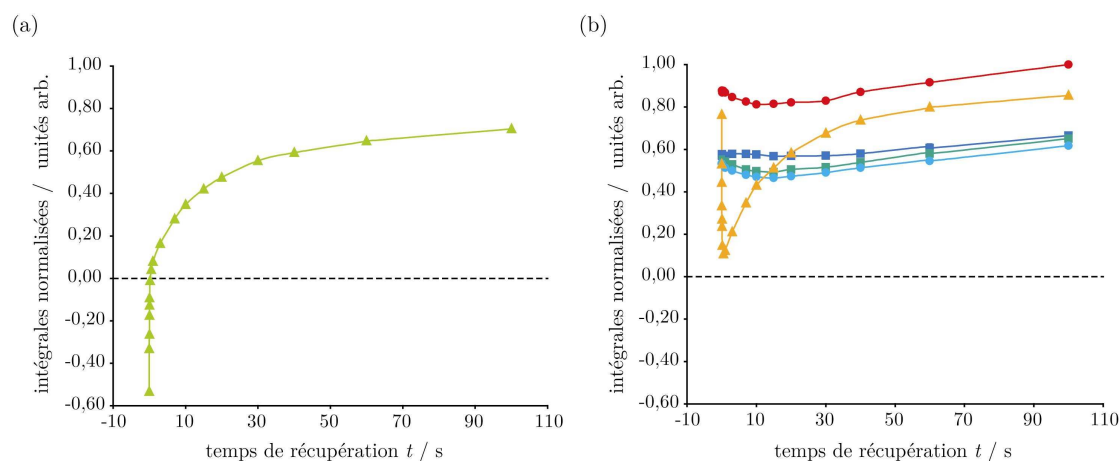
que l'expérience décrite en Figure 5-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par un temps de contact de 2 ms et par une force de champ rf moyen sur la voie proton de 63 kHz et sur la voie carbone de 54 kHz. Une rampe de puissance a été appliquée sur le canal proton <sup>256</sup>. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 54 kHz également. Les impulsions sélectives, de type Iburp-1 pour les inversions et de type Eburp-2 pour les excitations, ont été créées de façon à n'exciter qu'un type de résonance à la fois (carbonyles, aromatiques, C<sub>α</sub> ou C<sub>β</sub>). Leur durée était de 3,75 à 10 ms pour les inversions et de 2 ms pour les excitations.

#### 5.1.5 Mesure des constantes de temps de relaxation à haute vitesse de rotation à l'angle magique

Une fois encore, dans ce régime, l'aimantation après une expérience de polarisation croisée ou d'excitation directe large bande revient à l'équilibre en suivant une mono-exponentielle. Malgré des constantes de temps différentes, les courbes obtenues sont similaires qualitativement à celles enregistrées à 9 kHz de vitesse de rotation (Cf. Figure 5-4). Les valeurs moyennes des constantes de temps de relaxation longitudinale du proton  $T_{1H}^*$  sont de 0,9 s et 3,4 s pour la forme A et B de l'histidine, respectivement. Les constantes de temps du carbone  $T_{1C}^*$  sont de 60 s pour la forme A et de 99 s pour la forme B. Comme les couplages dipolaires sont mieux moyennés à 30 kHz de vitesse de rotation, ces valeurs moyennes ainsi que les variations autour d'elles sont plus importantes qu'à 9 kHz de vitesse de rotation. Notamment, la constante de temps des carbones de la forme A est beaucoup plus importante, ceci étant probablement dû au fait que les couplages dipolaires avec le spin électronique de l'ion Cu<sup>2+</sup> paramagnétique sont mieux moyennés, ion qui devient de ce fait un moins bon agent de relaxation (Cf. Figure 5-8 (a)).

Après inversion sélective, la récupération de l'aimantation du carbone est qualitativement la même qu'à 9 kHz de vitesse de rotation. Elle a également lieu en deux temps, décrits par une composante rapide et une composante lente (Cf. Figure 5-7). La composante rapide est cependant beaucoup plus lente qu'à 9 kHz de vitesse de rotation, particulièrement dans le cas des carbones des carboxyles (Cf. Table 5-2). Nous avons pu également observer que seuls les spins de carbone ayant un déplacement chimique proche de celui du spin inversé contribuent au mécanisme de diffusion de spin permettant la récupération plus rapide de son aimantation. Les autres spins peuvent également transférer une partie de leur aimantation mais à une échelle de temps

plus longue. Ceci est illustré sur la Figure 5-7. Après inversion sélective du  $C_\alpha$  de la forme B, le carbone  $\beta$ , le plus proche en déplacement chimique, présente une diminution rapide de son aimantation longitudinale avant de retourner à l'équilibre. Les autres spins, avec lesquels la différence de déplacement chimique est plus importante, présentent une diminution moindre et beaucoup plus lente de leur aimantation longitudinale. Les aimantations des spins appartenant à la forme A ne sont pas modifiées.



**Figure 5-7.** Courbes de récupération de l'aimantation après inversion sélective de la résonance du  $C_\alpha$  de la forme B de l'histidine à 30 kHz MAS. Evolution du signal (a) de la résonance du  $C_\alpha$  inversée (triangles vert clair) et (b) du carboxyle (carrés bleus), du C2 (cercles rouges), du C4 (carrés vert foncé), du C5 (cercles bleu-vert) et du  $C_\beta$  (triangles oranges) de la forme B. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-1 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. La force de champ rf de découplage était de 120 kHz. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 55 kHz. L'impulsion sélective, de type Iburp-1, a été créée de façon à n'exciter que les résonances des  $C_\alpha$  (dans ce cas). Sa durée était de 4 ms. Le temps entre chaque scan était de 125 s, soit environ 5 fois la valeur de la composante lente des constantes de relaxation sélectives.

Ces observations montrent à nouveau que la diffusion de spin est moins efficace à haute vitesse de rotation. Cependant, même à 30 kHz de vitesse de rotation, la composante lente de la récupération d'aimantation après inversion sélective est beaucoup plus rapide que la constante de temps des carbones après une excitation large bande (Cf. Figure 5-8 (a)).

### 5.1.6 Mesure du signal sur bruit par unité de temps à haute vitesse de rotation à l'angle magique

Les courbes de signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculées grâce aux  $T_1^*$  mesurés et à l'équation 1-12 sont comparées sur la Figure 5-8 (b) et (c) pour les expériences de polarisation croisée, d'excitation directe large bande et d'excitation sélective à 30 kHz de vitesse de rotation. Malgré la diffusion de spin moins efficace, la sensibilité par unité de temps de l'expérience d'excitation sélective surpasse en théorie celle de la polarisation croisée pour des temps de répétition de l'expérience très courts ( $T_{\text{scan}} < 1$  s) dans le cas des  $C_\alpha$  (Cf. Figure 5-8 (c)). Cependant, expérimentalement, parce que les couplages dipolaires sont mieux moyennés à 30 kHz de vitesse de rotation, le bain de carbones entourant le spin excité s'amointrit. Ceci a pour conséquence que même après très peu de scans, nous avons pu observer une dépolarisation des spins à l'équilibre, et donc une perte de sensibilité comparée aux valeurs théoriques. Le comportement des carbones aromatiques est similaire à celui du  $C_\alpha$ . Dans le cas des résonances des carboxyles, la diffusion de spin devient tellement lente que théoriquement, même pour des temps de répétition très courts, l'excitation directe ne peut pas concurrencer la polarisation croisée (Cf. Figure 5-8 (b)).

Ces résultats obtenus sur l'histidine suggèrent que malgré le retour à l'équilibre plus rapide de l'aimantation grâce à l'utilisation d'impulsions sélectives, une telle approche ne semble pas très prometteuse pour le design de nouvelles séquences de RMN rapide dans le cas des solides cristallins. En effet, même s'il est possible de prédire que la sensibilité d'une expérience peut être significativement augmentée grâce à l'utilisation d'impulsions sélectives combinée à des temps de répétition d'expérience très courts, la dépolarisation du bain de carbones semble être une conséquence des longs temps de relaxation des spins constituant ce bain. Cependant, des temps de relaxation du carbone beaucoup plus courts peuvent être trouvés dans les échantillons biomoléculaires hydratés. Par conséquent, l'approche sélective peut être intéressante dans le but d'accélérer les expériences de RMN en phase solide biomoléculaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la sensibilité des expériences d'excitation sélective dans le cas de deux échantillons de protéines, MerP et YajG.



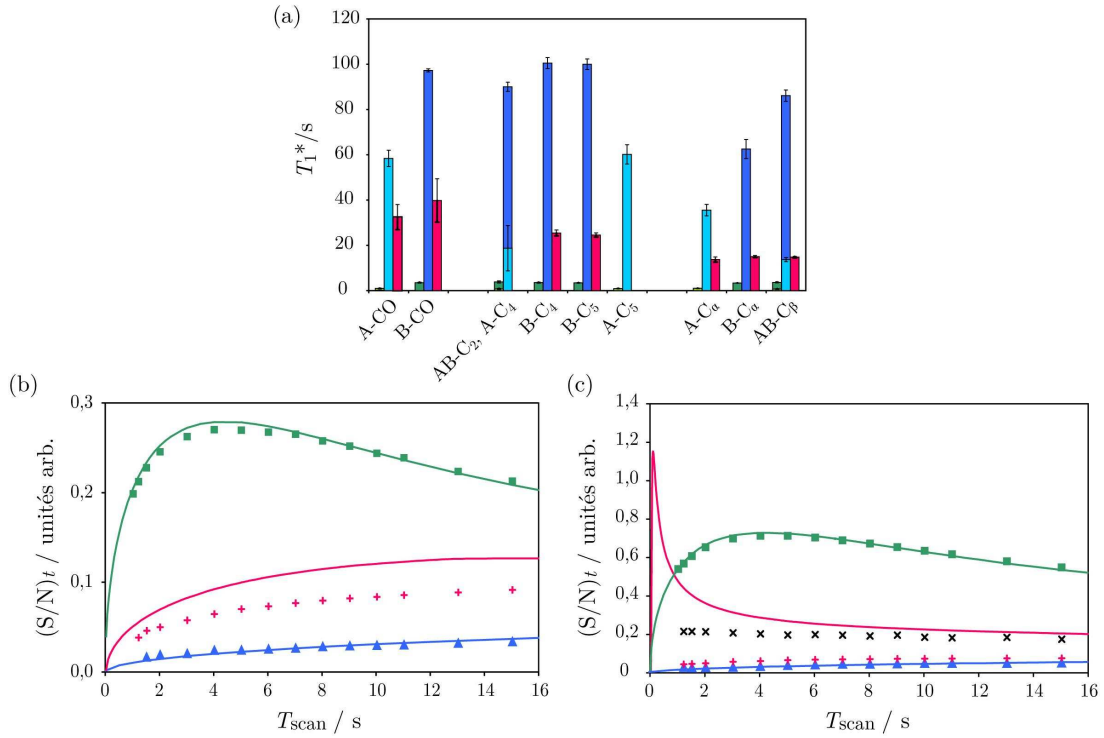


Figure 5-8. (a) Constantes de temps de relaxation longitudinales  $T_1^*$  mesurées sur l'histidine par inversion-récupération à 30 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique après une étape de polarisation croisée ( $T_{1H}^*$ , barres vertes), après excitation directe large bande ( $T_{1C}^*$ , barres bleu clair et bleu foncé pour les formes A et B de l'histidine, respectivement) et après excitation sélective ( $T_{1C}^*$ , barres rouges). Dans le cas des  $T_{1C}^*$  sélectifs, seule la composante longue de la courbe bi-exponentielle est représentée. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard lors de la détermination expérimentale des constantes de temps. (b) et (c) Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculé et expérimental en fonction du temps consacré à chaque scan  $T_{scan}$  pour (b) la résonance du carboxyle et (c) la résonance du C<sub>α</sub> de la forme B de l'histidine. Les lignes pleines représentent les courbes numériques calculées grâce à l'équation 5-2 en utilisant les valeurs expérimentales de  $T_1^*$  données dans la Table 5-2 pour les expériences de polarisation croisée (vert), d'excitation directe large bande (bleu), et d'excitation sélective (rouge). Le facteur de gain  $\eta$  est de 0,82 sur le graphe (b) et de 2,1 sur le graphe (c). Les courbes théoriques sont comparées aux points expérimentaux enregistrés par polarisation croisée (carrés verts), excitation directe large bande (triangles bleus) et excitation sélective (croix noires et signes plus rouges). Pour chaque point expérimental, 64 scans précédés de 32 « dummy » scans ont été accumulés, sauf pour les valeurs expérimentales représentées par une croix noire où seulement 2 scans après 2 « dummy » scans ont été enregistrés. Les expériences ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-1 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Le temps d'acquisition était de 30 ms. La force de champ rf de découplage était de 120 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont

été effectuées au même champ. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 62 kHz. La durée des impulsions sélectives, de type Iburp-1 pour les inversions et de type Eburp-2 pour les excitations, a varié de 4 à 5 ms dans le cas des inversions et était de 1,23 ms pour l'excitation. Dans le cas des expériences d'inversion-récupération, le temps entre chaque scan était de 20 s dans le cas des expériences commençant par une étape de CPMAS, 600 s dans le cas des expériences non-sélectives et 125 s dans le cas des expériences sélectives.

## 5.2 Cas d'échantillons de protéines hydratées

### 5.2.1 Préparation des échantillons

La protéine MerP de *Cupriavidus metallidurans* uniformément enrichie en carbone 13 et azote 15 a été produite comme expliqué ci-dessous par les Dr. Beate Bersch et Jacques Covès de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble. Le fragment d'ADN codant pour la partie cytoplasmique de MerP (résidus 20 à 91 de la séquence entière) a été amplifié par « Amplification en Chaîne par Polymérase » (ACP ou « Polymerase Chain Reaction », PCR) grâce aux amorces adéquates pour le sous-clonage dans le vecteur d'expression pET28a. L'authenticité de l'insert d'ADN généré par ACP a été confirmée par séquençage. Le plasmide résultant pET28a-MerPcyt a été utilisé pour transformer la bactérie hôte *Escherichia coli* BL21 (DE3) contenant l'ARN polymérase T7. Les bactéries fraîchement transformées ont été cultivées en milieu M9 à 37 °C avec du  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g/L) et du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose (2 g/L) comme seules sources d'azote et de carbone et supplémentées avec  $\text{MnCl}_2$  (0,1 mM),  $\text{ZnSO}_4$  (0,05 mM),  $\text{FeCl}_3$  (0,05 mM) et une solution de vitamines comme décrit dans la référence <sup>261</sup>. L'expression de la protéine a été induite par l'ajout de 0,5 mM d'isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside quand l'absorbance à 600 nm de la préparation cellulaire a atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8. Les cellules ont été cultivées toute la nuit à 20 °C et récoltées par centrifugation. La protéine a ensuite été purifiée comme décrit précédemment <sup>262</sup>. La protéine purifiée a alors été concentrée jusque 30 mg / mL dans une cellule Diaflow équipée avec une membrane YM-3 (Amicon corp.). La dernière solution tampon était une solution Tris / HCl à 50 mM et pH 7,5. Des cristaux adéquats pour la RMN en phase solide ont été obtenus par la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise (ou sitting-drop vapor diffusion) à 293 K comme expliqué ci-dessous. Les gouttes ont été préparées en mélangeant 20  $\mu\text{L}$  de MerP avec 20

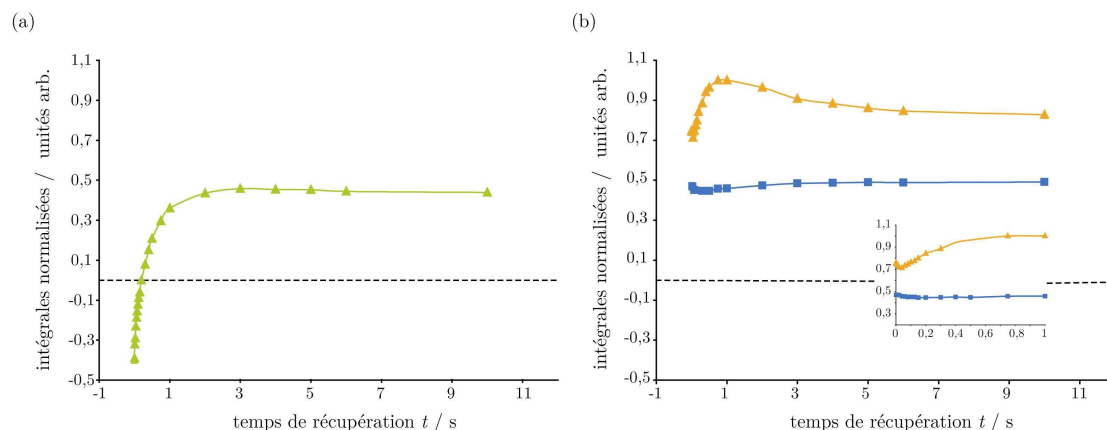
$\mu\text{L}$  de la solution du réservoir composée à 40 % de PEG 4000. Les cristaux sont apparus moins de 24 h après que les gouttes se soient équilibrées avec le millilitre de solution réservoir. Des cristaux originaux de 20 gouttes différentes ont été récoltés et centrifugés directement dans un rotor de 4 mm de diamètre.

L'échantillon de protéine YajG <sup>263</sup> uniformément enrichi en carbone 13 et azote 15 nous a été fourni par le Dr. Jean-Pierre Simorre de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble. La protéine a été lentement précipitée dans de l'eau et directement centrifugée dans un rotor de 2,5 mm de diamètre.

### 5.2.2 *Mesure des constantes de temps de relaxation et comportement de l'aimantation après manipulation sélective*

Comme avancé dans le paragraphe précédent, les constantes de temps de relaxation du proton  $T_{1H}^*$  ainsi que les constantes de temps non sélectives du carbone  $T_{1C}^*$  mesurées sur les échantillons hydratés de MerP et YajG sont bien plus courtes que celles mesurées sur l'échantillon cristallin d'histidine à la fois à 9 (Figure 5-10 (a)) et 30 kHz (Figure 5-11 (a)) de vitesse de rotation à l'angle magique. Les fonctions permettant l'ajustement des points expérimentaux sont toujours des mono-exponentielles. A 9 kHz de vitesse de rotation et dans le cas de MerP, les constantes de temps  $T_{1H}^*$  sont de 270 ms environ. Quand la vitesse de rotation monte à 30 kHz, les constantes de temps de relaxation du proton sont de 760 ms environ dans le cas de la protéine YajG. Les constantes de temps de relaxation du carbone non sélectives sont d'environ 1 s à 9 et 30 kHz de vitesse de rotation, sauf pour les résonances des CO qui possèdent des constantes de temps de relaxation d'environ 3 s à 30 kHz de rotation. Les courbes de récupération de l'aimantation après manipulation sélective de certains carbones présentent un comportement similaire à celui décrit précédemment pour l'histidine, avec une composante très rapide provenant de la diffusion de spin et une composante plus lente. Cependant, dans le cas de l'inversion sélective des  $C_\alpha$  de YajG, le comportement de certains spins non-inversés est différent de celui des spins non-inversés de l'histidine. Les résonances des CO présentent bien une diminution de leur aimantation longitudinale suivie d'un retour à l'équilibre. Cependant, les résonances des  $C_\beta$  présentent un comportement en trois temps : tout d'abord une diminution rapide de leur aimantation que nous attribuons au même phénomène de rééquilibration par diffusion de spin que pour l'histidine et MerP, suivie d'une rapide augmentation de leur aimantation au-delà de l'état

d'équilibre et d'un lent retour à l'équilibre (Cf. Figure 5-9). Cette rapide augmentation de l'aimantation n'est pas tout à fait comprise, mais nous supposons qu'elle reflète un mécanisme de type nOe. Ceci est rendu possible grâce à (1) la mobilité des chaînes latérales et à (2) la courte période d'irradiation de découplage sur la voie proton pendant l'impulsion sélective suivie d'un temps d'attente de quelques millisecondes à quelques secondes. Cet effet est expliqué par Terao et ses collaborateurs dans le cas de la RMN en phase solide et appelé NOP<sup>254, 255</sup>. Un effet nOe hétéronucléaire a également été rapporté par Giraud *et al.* entre les atomes d'azote des groupes amides d'une protéine et les protons qui leur sont liés<sup>264</sup>. Le fait que, dans notre cas, ce phénomène n'apparaisse que pour la plage des C $_{\beta-\delta}$  contenant des CH<sub>3</sub> étaye notre hypothèse.



**Figure 5-9.** Courbes de récupération de l'aimantation après inversion sélective de la résonance du  $C_\alpha$  de YajG à 30 kHz MAS. Evolution du signal (a) de la résonance du  $C_\alpha$  inversée (triangles vert clair) et (b) des carboxyles et carbonyles (carrés bleus) et des  $C_\beta$  (triangles oranges). Dans le cas de (b), l'encart est un zoom des courbes pour des temps de récupération très courts. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 2,5 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 30$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 301 K (gaz « bearing » à 276 K). Le temps d'acquisition était de 20 ms. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL<sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 140 kHz. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 70 kHz. L'impulsion sélective, de type Iburp-1, a été créée de façon à n'exciter que les résonances des  $C_\alpha$  (dans ce cas). Sa durée était de 1600  $\mu$ s. Le temps entre chaque scan était de 25 s, soit environ 5 fois la valeur de la composante lente des constantes de relaxation sélectives.

La composante lente des constantes de temps sélectives est encore une fois inférieure aux constantes de temps non sélectives. Nous nous serions attendus à ce que ces deux constantes soient identiques pour tous les échantillons étudiés. Il nous a été proposé que cette différence puisse également être causée par un effet nOe. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à l'expérience suivante : les constantes de temps non sélectives ont été mesurées de la même manière que présentée dans le paragraphe 5.1.2 sauf qu'une période de découplage de 2 millisecondes a été appliquée sur la voie proton en même temps que l'impulsion large bande de 180 degrés sur la voie carbone, tout comme dans les expériences sélectives. Les constantes de temps mesurées se sont avérées identiques à celles mesurées lors des expériences d'inversion-récupération classiques. Si un effet nOe avait été présent, nous aurions dû observer une variation de ces constantes de temps. Nous proposons donc que le mécanisme nOe n'est pas responsable de la réduction de la composante lente des constantes de temps sélectives. Ce phénomène pourrait être attribué à des effets de diffusion de spins à longue distance.

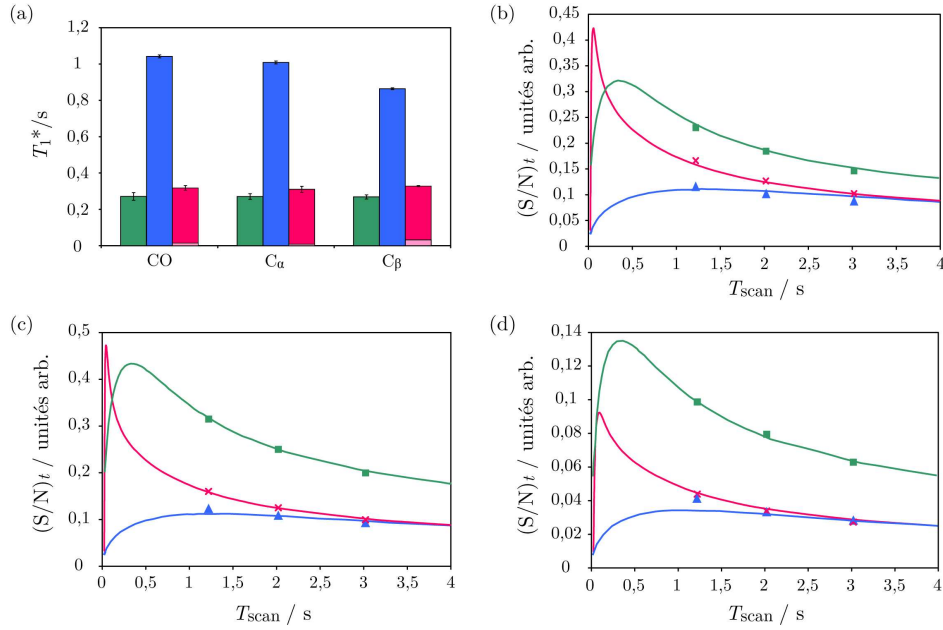
Les composantes courtes mesurées sur MerP et YajG (Cf. Table 5-3, Figure 5-10 (a) et Figure 5-11 (a)) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues sur l'histidine aux vitesses correspondantes (Cf. Table 5-2).

	CO	C <sub><math>\alpha</math></sub>	C <sub><math>\beta</math>-<math>\delta</math></sub>
MerP (9 kHz MAS)	14,23	7,94	31,66
YajG (30 kHz MAS)	620,66	50,15	65,66

**Table 5-3. Composante rapide  $T_{1C}^*$  en ms pour les différentes résonances des protéines hydratées.**

### 5.2.3 Mesure du signal sur bruit par unité de temps

Dans le cas de MerP à 9 kHz de vitesse de rotation, les valeurs des composantes lentes des constantes de temps de relaxation du carbone sélectives  $T_{1C}^*$  sont proches de celles des constantes de temps de relaxation du proton  $T_{1H}^*$ . Ceci n'est cependant pas suffisant pour concurrencer l'augmentation de polarisation obtenue par polarisation croisée. Comme illustré sur la Figure 5-10 (b-d), une meilleure sensibilité est théoriquement possible pour certains spins dans le cas d'expériences sélectives mais seulement pour des délais interscans très courts (inférieurs à 200 ms), délais qui ne peuvent être utilisés avec un découplage correct sans endommager la sonde et/ou l'échantillon.



**Figure 5-10.** (a) Constantes de temps de relaxation longitudinales  $T_1^*$  mesurées sur MerP par inversion-récupération à 9 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique après une étape de polarisation croisée ( $T_{1H}^*$ , barres vertes), après excitation directe large bande ( $T_{1C}^*$ , barres bleues) et après excitation sélective ( $T_{1C}^*$ , barres rouge clair et foncé pour les constantes courtes et longues, respectivement). Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard lors de la détermination expérimentale des constantes de temps. (b)-(d) Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculé et expérimental en fonction du temps consacré à chaque scan  $T_{\text{scan}}$  pour (b) les résonances des carboxyles et carbonyles, (c) les résonances des  $C_\alpha$  et (d) les résonances des  $C_{\beta\delta}$ . Les lignes pleines représentent les courbes numériques calculées grâce à l'équation 5-2 en utilisant les valeurs expérimentales de  $T_1^*$  données en (a) pour les expériences de polarisation croisée (vert), d'excitation directe large bande (bleu), et d'excitation sélective (rouge). Le facteur de gain apporté  $\eta$  est de 1,5 sur le graphe (b), de 2,0 sur le graphe (c) et de 2,2 sur le graphe (d). Les courbes théoriques sont comparées aux points expérimentaux enregistrés par polarisation croisée (carrés verts), excitation directe large bande (triangles bleus) et excitation sélective (croix rouges). Pour chaque point expérimental, 512 scans précédés de 8 dummy scans ont été accumulés. Les expériences ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-2 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. La température au sein de l'échantillon était de 280 K (gaz « bearing » à 268 K). Le temps d'acquisition était de 20 ms. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été caractérisé par une force de champ rf moyen sur la voie proton de 53 kHz et sur la voie carbone de 62 kHz. La durée des impulsions sélectives, de type Iburp-1 pour les inversions et de type Eburp-2 pour les excitations, a varié de 1210  $\mu\text{s}$  à 2790  $\mu\text{s}$ . Dans le cas des expériences d'inversion-récupération, le temps entre chaque scan était de 5 s (expériences commençant par une étape de CPMAS et expériences non-sélectives) ou de 2 s (expériences sélectives).

Dans le cas de YajG à 30 kHz de vitesse de rotation, la récupération de l'aimantation des carbones après manipulation sélective est globalement plus rapide que celle des protons, sauf dans le cas des résonances des carbonyles et carboxyles (Cf. Figure 5-11(a)). De plus, le transfert d'aimantation par polarisation croisée dans ces conditions expérimentales de vitesse de rotation et de champs radiofréquence s'est révélé très inefficace. Le facteur d'amélioration  $\eta$  apportée par la polarisation croisée n'est plus que de 1,1 pour les résonances des  $C_\alpha$  et des  $C_{\beta-\gamma}$ . Pour la région des CO, une meilleure sensibilité a pu être obtenue mais pour des temps de contact préjudiciables aux autres résonances. Dans de telles conditions, les expériences basées sur des excitations sélectives deviennent intéressantes en terme de sensibilité. En effet, comme illustré sur la Figure 5-11 (b-d), la sensibilité de l'expérience d'excitation sélective est meilleure que celle de la polarisation croisée pour toutes les résonances de YajG pour des temps de répétition de l'expérience plus courts que 1,5 secondes, l'optimum étant autour de 250 ms. Grâce à la relaxation plus rapide de l'aimantation des protons et des carbones dans ces échantillons hydratés, la dépolarisation des spins des carbones à l'équilibre dans le cas d'expériences sélectives n'a pu être observée ni sur MerP ni sur YajG pour des temps de répétition de l'expérience supérieurs à 1 s, des temps inférieurs n'étant pas compatibles avec un découplage « haute puissance ».

Afin d'explorer des temps de répétition plus courts sans détériorer la sonde et/ou l'échantillon, nous avons enregistré les mêmes expériences à 30 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique sur la protéine YajG mais en appliquant un découplage de type CW « basse puissance » pendant l'acquisition, au détriment de la résolution des pics de résonance. En effet, ce type de découplage ne devient comparable en efficacité aux séquences « haute puissance » qu'à partir de 40 kHz de vitesse de rotation <sup>237</sup>. Nous avons ainsi pu aborder des délais aussi courts que 100 ms. Les points expérimentaux ainsi que la courbe simulée du signal sur bruit par unité de temps peuvent être visualisés en Figure 5-12 dans le cas des  $C_\alpha$ . Une dépolarisation du bain de carbones est constatée pour des temps de répétition de l'ordre de 300 ms.

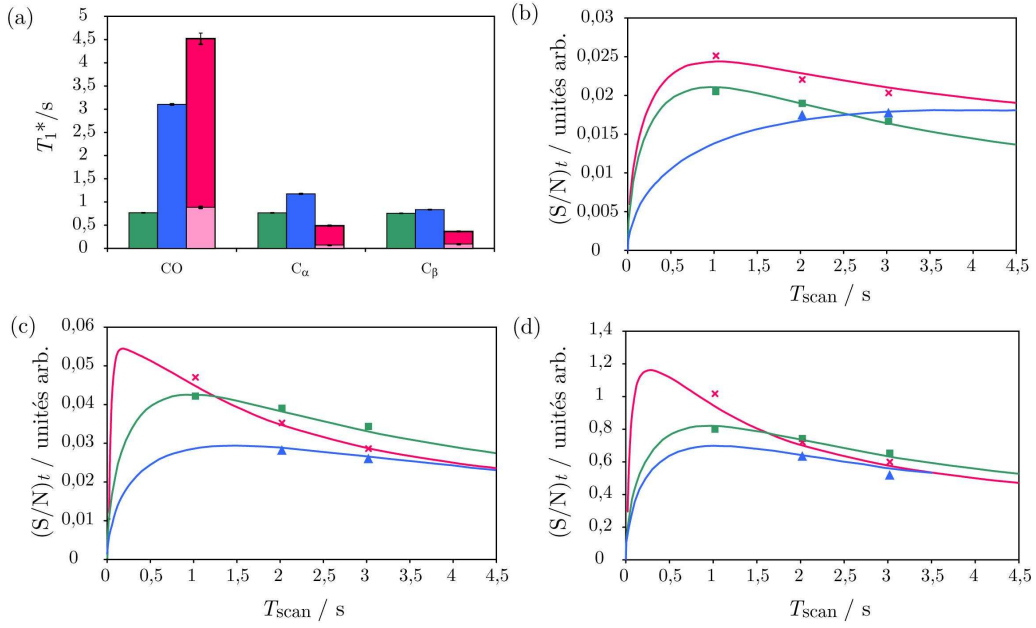


Figure 5-11. (a) Constantes de temps de relaxation longitudinales  $T_1^*$  mesurées sur YajG par inversion-récupération à 30 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique après une étape de polarisation croisée ( $T_{1H}^*$ , barres vertes), après excitation directe large bande ( $T_{1C}^*$ , barres bleues) et après excitation sélective ( $T_{1C}^*$ , barres rouge clair et foncé pour les constantes courtes et longues, respectivement). Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard lors de la détermination expérimentale des constantes de temps. (b)-(d) Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculé et expérimental en fonction du temps consacré à chaque scan  $T_{\text{scan}}$  pour (b) les résonances des carboxyles et carbonyles, (c) les résonances des  $C_\alpha$  et (d) les résonances des  $C_{\beta-\delta}$ . Les lignes pleines représentent les courbes numériques calculées grâce à l'équation 5-2 en utilisant les valeurs expérimentales de  $T_1^*$  données en (a) pour les expériences de polarisation croisée (vert), d'excitation directe large bande (bleu), et d'excitation sélective (rouge). Le facteur de gain  $\eta$  est de 0,58 sur le graphe (b), de 1,17 sur le graphe (c) et de 1,12 sur le graphe (d). Les courbes théoriques sont comparées aux points expérimentaux enregistrés par polarisation croisée (carrés verts), excitation directe large bande (triangles bleus) et excitation sélective (croix rouges). Pour chaque point expérimental, 400 scans précédés de 8 dummy scans ont été accumulés. Les expériences ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 2,5 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 30$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 301 K (gaz « bearing » à 276 K). Le temps d'acquisition était de 20 ms. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL<sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 100 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 145 kHz. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par un temps de contact de 1,5 ms et par une force de champ rf moyen sur la voie proton de 90 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz.



Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 70 kHz. La durée des impulsions sélectives, de type Iburp-1 pour les inversions et de type Eburp-2 pour les excitations, a varié de 1,15 ms à 2,8 ms dans le cas des inversions et de 1,27 à 3 ms dans le cas des excitations. Dans le cas des expériences d'inversion-récupération, le temps entre chaque scan était de 5 s (expériences commençant par une étape de CPMAS), de 30 s (expériences non-sélectives) ou de 25 s (expériences sélectives).

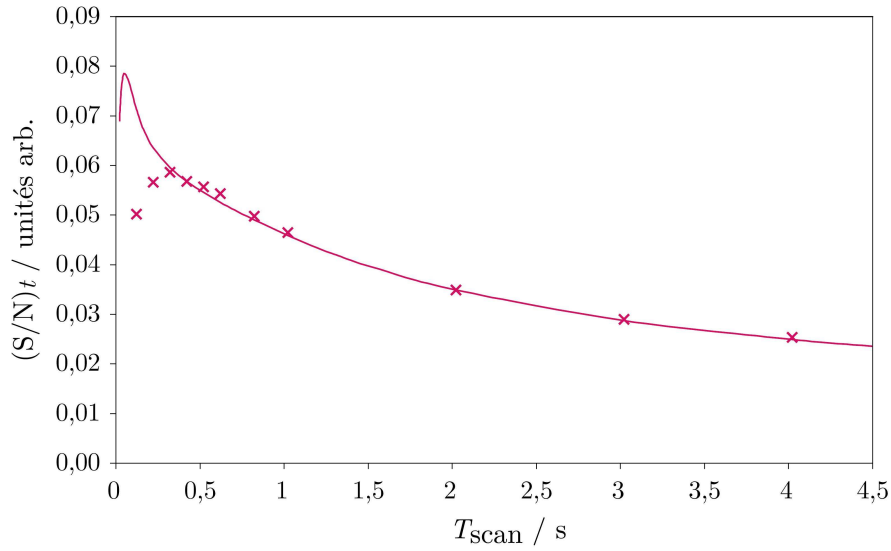


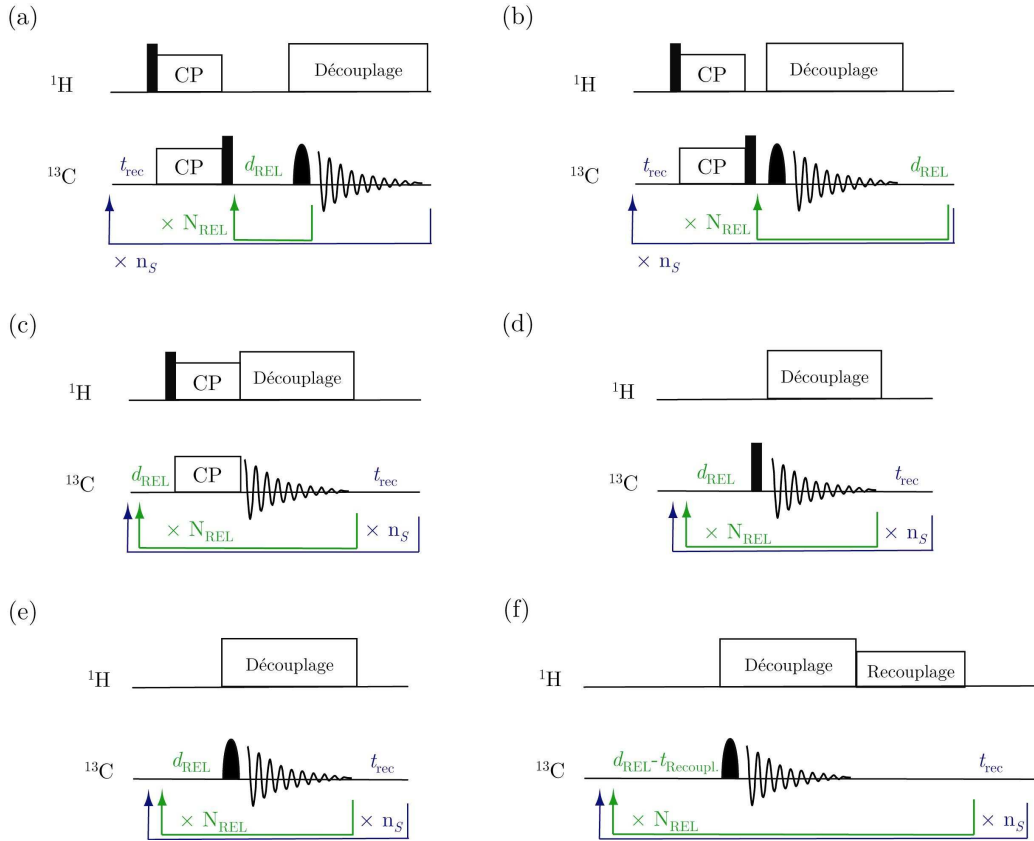
Figure 5-12. Dépolarisation du bain de carbones dans un échantillon de protéine hydratée. Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  calculé et expérimental en fonction du temps consacré à chaque scan  $T_{\text{scan}}$  pour les résonances des  $C_\alpha$  de YajG. La ligne pleine représente la courbe numérique calculée grâce à l'équation 5-2 en utilisant les valeurs expérimentales de  $T_1^*$  données en Figure 5-11 pour les expériences d'excitation sélective. La courbe théorique est comparée aux points expérimentaux enregistrés par excitation sélective (croix rouges). Pour chaque point expérimental, 256 scans précédés de 32 dummy scans ont été accumulés. Les expériences ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 2,5 mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 30$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 263 K (gaz « bearing » à 235 K). Le temps d'acquisition était de 20 ms. Pendant l'acquisition, du découplage hétéro-nucléaire de type CW a été utilisé, à une force de champ rf de 7,5 kHz. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 62 kHz. La durée des impulsions sélectives, de type Eburp-2, était de 1640  $\mu\text{s}$ .

#### 5.2.4 Excitations directes sélectives et CPMAS-RELOAD

Lors de la parution de notre article traitant du retour à l'équilibre plus rapide de l'aimantation après utilisation d'une impulsion sélective, Glaubit et ses collaborateurs ont proposé une idée basée sur le même principe d'impulsions sélectives : l'effet RELOAD<sup>253</sup> (Cf. chapitre précédent). Cette idée paraît avoir un avantage certain par rapport à la séquence d'excitation directe sélective que nous proposons. En effet, en plus de l'utilisation d'impulsions sélectives sur la voie carbone, cette séquence bénéficie du gain en sensibilité apportée par l'étape de polarisation croisée. Nous nous sommes alors posés les questions suivantes : lors de l'utilisation d'une séquence CPMAS en combinaison avec l'effet RELOAD, sur combien de scans se ressent l'effet de l'étape de CP ? Quel est le gain en signal sur bruit d'une telle expérience par rapport à celle que nous proposons et également par rapport aux techniques classiques ? En d'autres termes, comment nous positionnons-nous par rapport aux travaux de Glaubit *et al.* ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons mis en place des séquences permettant de mesurer l'effet de chaque scan sur le signal accumulé (Cf. Figure 5-13). Prenons l'exemple de la séquence illustrée en Figure 5-13 (d). Elle permet de déterminer l'effet de chaque scan sur le signal accumulé lors d'une expérience utilisant une excitation directe large bande. Dans un premier temps, après la séquence d'impulsions, le signal est acquis et enregistré en mémoire tampon n°1. Après un délai  $d_{REL}$ , la séquence d'impulsions reprend. Le signal est à nouveau acquis et enregistré, mais cette fois en mémoire tampon n°2. Cette étape est réalisée  $N_{REL}$  fois, soit 16 fois dans notre cas. Nous avons donc enregistré le signal dans 16 mémoires tampon différentes, chacune contenant uniquement le signal enregistré au  $N_{REL}^{ième}$  scan, mais de façon non-cumulée. Seul le signal apporté par le  $N_{REL}^{ième}$  scan est enregistré dans la mémoire tampon numéro  $N_{REL}$ . Afin d'augmenter la sensibilité du signal observé dans chaque mémoire tampon, nous laissons le temps à l'aimantation de revenir complètement à l'équilibre pendant le délai  $t_{rec}$ . Nous recommençons alors l'acquisition dans  $N_{REL}$  mémoires tampon différentes. Cette expérience peut être visualisée après une transformation de Fourier comme une pseudo 2D. Chaque ligne représente le signal acquis pendant le  $N_{REL}^{ième}$  scan uniquement. Cette méthode d'acquisition peut être appliquée à toute séquence. Nous l'avons testée sur la séquence CPMAS-RELOAD, CPMAS, excitation directe large bande, excitation directe sélective et excitation directe suivie d'une étape de recouplage (Cf. Figure 5-13 (b)-(f)). Glaubit *et al.* ont proposé une séquence permettant également de visualiser l'effet de chaque scan sur le signal

cumulé. Cependant, leur méthode demande beaucoup plus de temps puisque le signal n'est pas enregistré scan après scan dans des mémoires tampon différentes. Au contraire, les auteurs répètent plusieurs fois ( $N_{REL}$ ) la séquence d'impulsions sans faire l'acquisition du signal avant de l'enregistrer. Leur méthode nécessite  $N_{REL}$  expériences et la nôtre seulement une.



**Figure 5-13.** (a) Version modifiée de la séquence CPMAS-RELOAD utilisée par Glaubitz *et al.* afin de déterminer les conditions de  $d_{REL}$ ,  $t_{rec}$  et  $N_{REL}$  où le signal sur bruit est le meilleur. Séquences que nous avons utilisées afin de visualiser l'effet de chaque scan sur le signal accumulé lors (b) d'une expérience de CPMAS-RELOAD, (c) d'une expérience de CPMAS, (d) d'une expérience d'excitation directe large bande, (e) d'une expérience d'excitation sélective et (f) d'une expérience d'excitation sélective couplée à une période de recouplage.

Comme à la fin du paragraphe précédent, nous nous sommes intéressés à des temps de répétition de l'expérience assez courts. Pour ce faire, nous avons appliqué un découplage de type CW « basse puissance » valant  $\frac{1}{4}$  de la vitesse de rotation. Nous avons ainsi pu appliquer les séquences (b) à (f) sur un échantillon de la protéine YajG à 30 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique pour des délais  $d_{REL}$  allant de 0,1 à 2 s. L'aire du signal enregistré lors

de chaque scan, de façon non cumulée, peut être visualisée en Figure 5-14 pour des expériences de CPMAS-RELOAD, CPMAS classique, excitation directe sélective, excitation directe large bande et excitation directe sélective combinée à une période de recouplage de type MIRROR<sup>265</sup>.

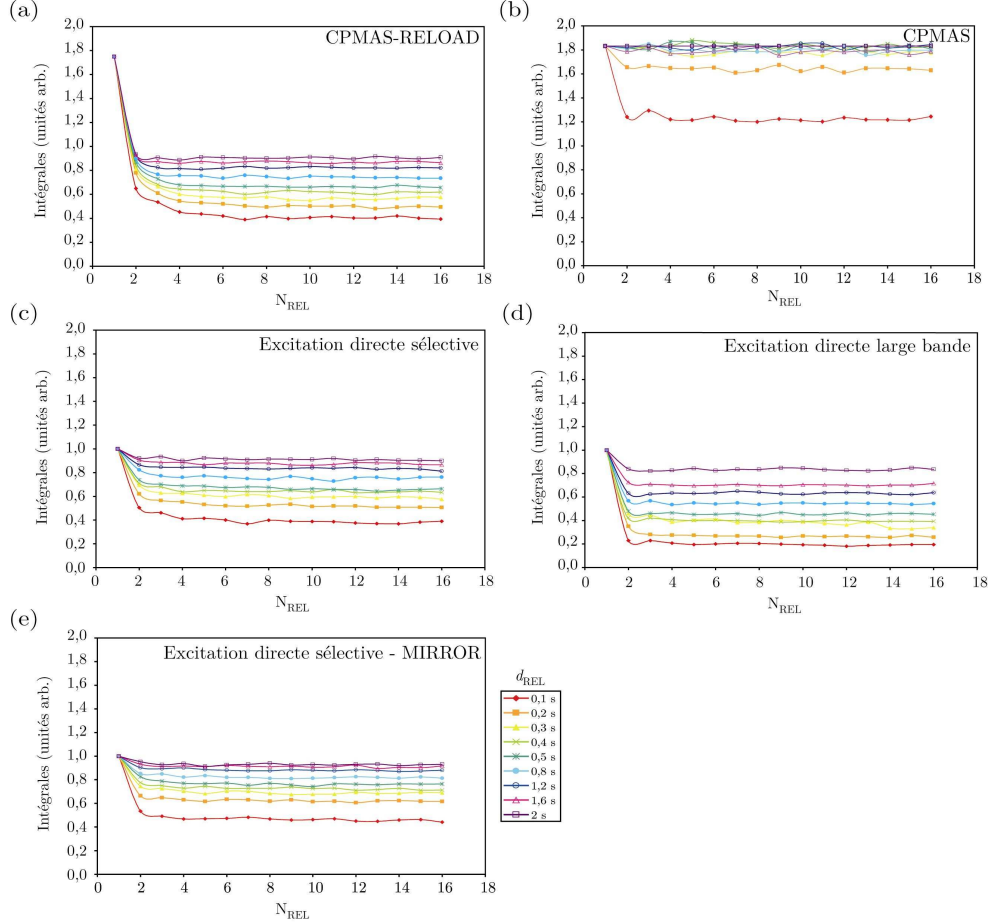


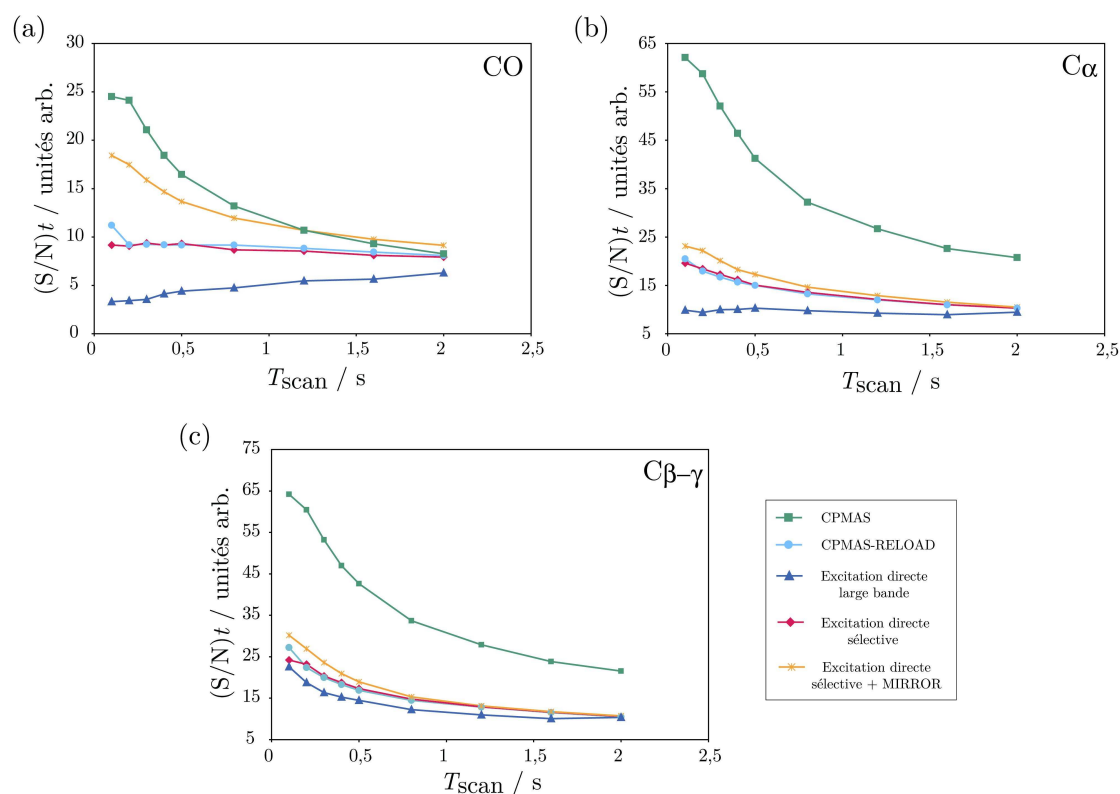
Figure 5-14. Signal apporté par les 16 premiers scans lors (a) d'une expérience de type CPMAS-RELOAD, (b) d'une expérience de type CPMAS classique, (c) d'une excitation directe sélective, (d) d'une excitation directe large bande et (e) d'une excitation directe sélective couplée à une période de recouplage MIRROR<sup>265</sup> sur un échantillon de YajG et plus particulièrement pour la plage des  $C_a$ . Les expériences ont été enregistrées dans les mêmes conditions que l'expérience décrite en Figure 5-12 sauf pour les paramètres décrits ci-dessous. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 140 kHz. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par une force de champ rf moyen sur la voie proton de 90 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Le temps de contact était de 1,25 ms. La durée des excitations sélectives, de type Eburp-2, a varié de 1150 à 2240  $\mu$ s. Le délai  $t_{rec}$  était de 20 s. Le délai  $d_{REL}$  a été varié comme indiqué sur la figure. Le temps pendant lequel le recouplage MIRROR<sup>265</sup> a été appliqué était de 80 ms.

Une première lecture rapide de ces courbes nous apprend que parmi toutes les séquences testées, l'expérience CPMAS classique est la méthode permettant d'obtenir le plus de signal (graphe (b) de la Figure 5-14). Nous apprenons également que le gain en sensibilité apportée par l'étape de CP dans la séquence de Glaubitz *et al.* ne semble être présent que pour le premier scan (graphe (a)). En effet, après ce premier scan, le signal apporté par chaque scan semble être très similaire à celui enregistré lors d'une expérience d'excitation sélective (graphe (c)). Nous pouvons également constater que les expériences basées sur l'utilisation d'une excitation sélective (directe ou après une étape de CPMAS comme lors de l'expérience CPMAS-RELOAD, graphes (c) et (a), respectivement) semblent apporter plus de signal qu'une expérience d'excitation sélective large bande (graphe (d)). Enfin, l'utilisation combinée d'impulsions sélectives et d'un recouplage actif MIRROR mène à l'enregistrement d'un signal encore plus intense (graphe (e)) que lors d'une expérience d'excitation directe large bande ou sélective. Ceci sera commenté dans le paragraphe suivant.

L'interprétation de ces courbes est facilitée par le calcul du signal sur bruit par unité de temps (Cf. Figure 5-15). Celui-ci a été calculé en sommant les valeurs d'intégrales apportées par chaque scan et en divisant le tout par la racine de  $d_{REL}$ . L'effet des trois premiers scans a été négligé. En effet, les échantillons de protéines sont souvent très peu sensibles, il faut donc accumuler bien plus que 16 scans pour pouvoir bénéficier d'un signal sur bruit correct. Les courbes représentées ont été calculées dans le cas des  $C_\alpha$  mais un comportement similaire a pu être observé pour les autres spins. La lecture de ces courbes de signal sur bruit nous montre que, comme expliqué dans un paragraphe précédent pour des temps inter-scans plus longs, la sensibilité de l'expérience d'excitation directe large bande est beaucoup moins bonne que celle de l'expérience de CPMAS classique pour des temps entre chaque scan très courts. La sensibilité de l'expérience d'excitation directe sélective se situe entre les deux. Ce résultat va à l'encontre de celui présenté dans le paragraphe 5.2.3. Ceci peut être expliqué ainsi. Suite à un crash de notre rotor de YajG utilisé lors de l'étude relatée dans le paragraphe 5.2.3, un nouvel échantillon nous a été fourni par l'équipe de Jean-Pierre Simorre. Cependant, lors de la préparation de l'échantillon, il n'est pas possible de contrôler précisément le taux d'hydratation. Celui-ci a donc pu être légèrement différent d'un échantillon à l'autre. Cette différence peut expliquer les variations observées dans les constantes de temps de relaxation des spins d'un échantillon à l'autre. Plus particulièrement, dans le cas du premier échantillon où l'utilisation d'impulsions sélectives est avantageuse, les constantes de temps des protons

sont supérieures aux composantes longues des constantes de temps de relaxation sélectives du carbone. Ceci n'est pas le cas pour le deuxième échantillon (Cf. Table 5-4). Cette différence a pu influencer de façon importante les courbes de signal sur bruit par unité de temps. Ceci peut même constituer une condition sine qua non à l'utilisation bénéfique des impulsions sélectives.

Les courbes nous apprennent également que le signal sur bruit d'une expérience d'excitation directe sélective est équivalent à celui d'une expérience de type CPMAS-RELOAD. Ceci nous montre que les expériences de Glaubitz ne bénéficient qu'à peine du gain en sensibilité apporté par l'étape de polarisation croisée. Le signal sur bruit des expériences d'excitations sélectives combinées avec le recouplage MIRROR est discuté dans le paragraphe suivant.



**Figure 5-15.** Signal sur bruit par unité de temps des expériences de CPMAS classique (en vert), de CPMAS-RELOAD (en bleu clair), d'excitation directe large bande (en bleu foncé), d'excitation directe sélective (en rose) et d'excitation directe sélective couplée à une période de recouplage MIRROR <sup>265</sup> (en orange) pour (a) les carboxyles et carbonyles, (b) les C $\alpha$  et (c) les C $\beta$ - $\gamma$  de la protéine YajG. Signal sur bruit calculé à partir des données présentées en Figure 5-14.

	$T_{1H}^*$	$T_{1C}^*$ non-sélectif	$T_{1C}^*$ sélectif long	$T_{1C}^*$ sélectif court
1 <sup>er</sup> échantillon de YajG	0,765	1,175	0,488	0,051
2 <sup>ème</sup> échantillon de YajG	0,399	1,535	0,469	0,029

**Table 5-4. Constantes de temps de relaxation des protons et des carbones  $C_\alpha$  pour les deux échantillons de YajG utilisés, mesurées à une vitesse de rotation à l'angle magique de 30 kHz.**

### 5.2.5 Vers le régime « Ultrafast »

D'après les courbes de signal sur bruit, il semble que l'utilisation d'impulsions sélectives à 30 kHz de MAS ne soit pas meilleure en termes de sensibilité que celle de la polarisation croisée. Selon l'échantillon étudié, le signal sur bruit peut être amélioré mais seulement pour des temps inter-scan très courts, au détriment de la résolution.

L'utilisation d'impulsions sélectives dans le régime « ultrafast » pourrait combiner gain en sensibilité et résolution. En effet, à 60 kHz de vitesse de rotation, il est possible d'appliquer un découplage « basse puissance » qui permet une aussi bonne résolution que celle obtenue avec des blocs de découplage « haute puissance »<sup>237</sup>. Il est donc possible de répéter très rapidement les expériences sans endommager la sonde ou l'échantillon tout en conservant une très bonne résolution. Cependant, dans le régime « ultrafast », nous avons pu constater expérimentalement que la diffusion de spins n'est plus aussi efficace qu'à des vitesses de rotation plus basse, voire plus du tout. L'effet de ce manque d'efficacité peut être observé lors de la mesure des constantes de temps de relaxation du carbone par inversion-récupération (Cf. Figure 5-16). Les constantes mesurées sont complètement différentes selon le type de carbone observé. De plus, sur une plage de déplacements chimiques donnée, telle que celle correspondant aux  $C_\alpha$ , les points expérimentaux ne sont pas correctement ajustés par une fonction mono-exponentielle dans le cas non-sélectif. La constante mesurée est donc une moyenne des constantes de relaxation de chaque spin résonant dans cette plage. Cette perte d'efficacité de la diffusion de spin a par ailleurs fait l'objet d'une publication par un autre groupe<sup>266</sup>. Cet effet est un inconvénient majeur de la méthode proposée par Glaubitz *et al.* La séquence CPMAS-RELOAD ne peut pas être utilisée à de hautes vitesses de rotation.

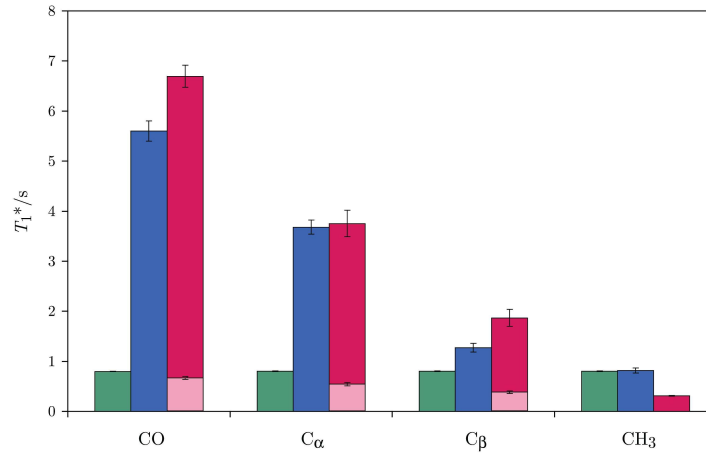
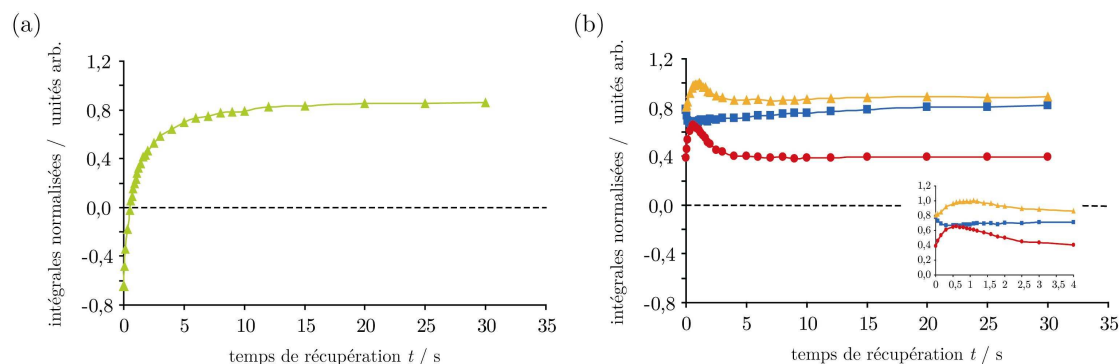


Figure 5-16. (a) Constantes de temps de relaxation longitudinales  $T_1^*$  mesurées sur YajG par inversion-récupération à 60 kHz de vitesse de rotation à l'angle magique après une étape de polarisation croisée ( $T_{1H}^*$ , barres vertes), après excitation directe large bande ( $T_{1C}^*$ , barres bleues) et après excitation sélective ( $T_{1C}^*$ , barres rouge clair et foncé pour les constantes courtes et longues, respectivement). Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard lors de la détermination expérimentale des constantes de temps et de l'ajustement des courbes. Les expériences ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker équipé d'une sonde double-résonance 1,3 mm avec  $\omega_H/2\pi = 850$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 60$  kHz. La température au sein de l'échantillon était de 295 K (gaz « bearing » à 255 K). Le temps d'acquisition était de 20 ms. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type « low power TPPM » a été utilisé <sup>240</sup>, à une force de champ rf de 15 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 132 kHz. Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par un temps de contact de 1 ms pour les  $C_\alpha$  et de 1,6 ms pour les carboxyles et les  $C_{\beta-\delta}$  et par une force de champ rf sur la voie proton de 45 kHz et sur la voie carbone de 15 kHz. Une rampe de puissance a été appliquée sur le canal carbone <sup>256</sup>. Les impulsions rf large bande sur la voie carbone ont été effectuées à un champ de 72 kHz. Les impulsions sélectives, de type Eburp-2, ont été créées de façon à n'exciter qu'un type de résonance à la fois (carbonyles et carboxyles,  $C_\alpha$  ou  $C_{\beta-\delta}$ ). Leur durée a varié de 580 à 990  $\mu$ s. Le temps entre chaque scan était de 5 s (CP) ou de 25 s (excitation directe).

Les courbes d'inversion-récupération sélectives que nous avons mesurées présentent globalement les mêmes caractéristiques qu'à de plus basses vitesses de rotation : le spin sélectivement inversé présente un retour à l'équilibre en deux temps. Les spins non-inversés voient leur aimantation décroître avant de revenir à l'équilibre avec le spin inversé. De plus, comme à 30 kHz de vitesse de rotation, l'aimantation des carbones  $\beta$ - $\gamma$  augmente rapidement par effet nOe, causé par la relativement grande mobilité de ces carbones appartenant à des chaînes latérales. La croissance de l'aimantation est significative (de



l'ordre de 50 %). Dans ce cas, la diffusion de spin est tellement inefficace que la courbe d'aimantation de ces spins ne présente pas de rapide décroissance (Cf. Figure 5-17).



**Figure 5-17.** Courbes de récupération de l'aimantation après inversion sélective de la résonance du  $C_\alpha$  de YajG à 60 kHz MAS (a) de la résonance du  $C_\alpha$  inversée (triangles vert clair) et (b) des résonances des carboxyles et carbonyles (carrés bleus), des  $C_{\beta-\gamma}$  ayant un déplacement chimique supérieur à 22 ppm (triangles oranges) et des  $C_{\beta-\gamma}$  ayant un déplacement chimique inférieur à 22 ppm (cercles rouges). Dans le cas de (b), l'encart est un zoom des courbes pour des temps de récupération très courts. Les expériences d'inversion-récupération ont été enregistrées comme indiqué sur la Figure 5-16.

Comme la diffusion de spin n'est plus capable de transférer l'aimantation dans le régime « ultrafast », il est donc nécessaire de rétablir le contact entre les spins de façon à ce que l'aimantation du spin excité puisse revenir plus rapidement à l'équilibre malgré l'absence de diffusion de spins. Les techniques de recouplage disponibles actuellement à 60 kHz MAS et faciles à mettre en place ne sont pas nombreuses. La séquence DARR<sup>267, 268</sup>, qui permet d'accélérer la diffusion de spins grâce à une irradiation des protons à la condition  $R^3$  (« Rotary Resonance Recoupling »), ne donne pas de bons résultats à des vitesses de rotations supérieures à 30 kHz. Néanmoins, la séquence de recouplage MIRROR<sup>265</sup> proposée par Ernst *et al.*, qui fait correspondre la valeur de l'irradiation rf sur le canal proton avec la différence de déplacement chimique entre les deux spins à recoupler, semble être efficace même à de très hautes vitesses de MAS. Cette méthode a été vérifiée expérimentalement à 40 kHz de vitesse de rotation. Comme nous n'avons pas de sonde « ultrafast » dans notre laboratoire, nous avons commencé par comparer l'efficacité de la séquence composée d'une impulsion sélective et d'une période de recouplage actif MIRROR après l'acquisition à l'efficacité obtenue via les autres séquences à 30 kHz de vitesse de rotation. La séquence sélective/MIRROR permet-

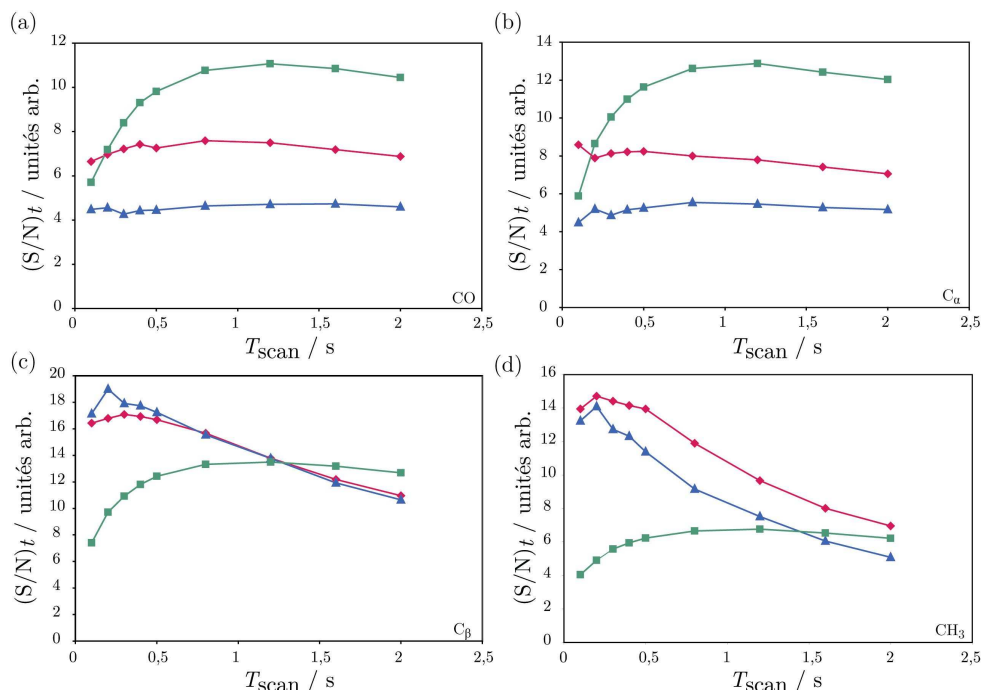
tant d'enregistrer l'effet de chaque scan est représentée en Figure 5-13 (f), le signal apporté par chaque scan lors de cette expérience en Figure 5-14 (e) et enfin les courbes de signal sur bruit en Figure 5-15. L'application du recouplage actif juste après l'acquisition améliore sensiblement le signal sur bruit comparé au signal sur bruit des expériences d'excitation directe et de CPMAS-RELOAD, ce qui est très prometteur. Cependant, dans ce régime et pour le deuxième échantillon de YajG, aucune expérience ne peut concurrencer avec la CPMAS classique.

L'effet du recouplage actif dans le régime « ultrafast » a été testé lors d'une semaine d'expériences au CERM, à Florence, en Italie. Nous avons testé l'effet du recouplage MIRROR grâce à la séquence suivante : après une impulsion sélective de 90 degrés et l'acquisition, une période de recouplage MIRROR est introduite avant le délai  $t_{\text{rec}}$  de retour à l'équilibre de l'aimantation. Cette séquence est similaire à celle présentée en Figure 5-13 (f) sauf que les scans sont accumulés comme lors d'une expérience classique. Le temps entre chaque scan était de 100 ms. Nous nous sommes rendu compte qu'à une telle vitesse de rotation (60 kHz), la période de recouplage MIRROR ne permet pas du tout d'augmenter l'intensité des pics des  $C_\alpha$  et des  $C_{\beta-\gamma}$ . De plus, nous avons enregistré de nombreux artefacts lors de l'application de notre séquence sur ces spins. Leur origine nous est encore inconnue. Seule l'intensité des pics correspondants aux carboxyles et carbonyles a pu être augmentée de 34 % pour un temps de contact de 100 ms, soit tout le temps laissé aux spins pour retourner à l'équilibre entre chaque scan.

Afin d'être capable d'utiliser l'effet des impulsions sélectives dans des expériences multidimensionnelles en obtenant une sensibilité supérieure à celle obtenue lors de l'utilisation d'une CP et ce pour tous les spins, il faudra donc penser à une autre technique de recouplage qui soit suffisamment efficace dans un tel régime. Cette technique devra également être efficace à une échelle de temps compatible avec des méthodes de RMN rapide. En effet, la technique MIRROR pourrait peut-être apporter un gain en sensibilité à 60 kHz de rotation, mais le temps de contact devrait dans ce cas être très long (de l'ordre de la seconde) !

Lors de cette semaine d'expérimentation à Florence, nous avons également mesuré le signal sur bruit des séquences CPMAS, excitation sélective et excitation directe large bande, grâce aux séquences illustrées en Figure 5-13 (c)-(e). Ces courbes de signal sur bruit sont illustrées en Figure 5-18. Ces courbes montrent que le signal sur bruit d'une expérience de type CPMAS est meilleur pour les résonances des carboxyles, des carbonyles et des  $C_\alpha$  mais est supplanté pour des temps inter-scan inférieurs à 1 s environ par le signal sur

bruit des expériences d'excitation directe pour les résonances des  $C_{\beta-\gamma}$ , et plus particulièrement pour ces résonances ayant un déplacement chimique inférieur à 20 ppm, correspondant principalement à des  $CH_3$ .



**Figure 5-18.** Signal sur bruit par unité de temps  $(S/N)_t$  expérimental en fonction du temps consacré à chaque scan  $T_{scan}$  pour (a) les résonances des carboxyles et carbonyles, (b) les résonance des  $C_\alpha$ , (c) les résonances des  $C_{\beta-\gamma}$  ayant un déplacement chimique supérieur à 20 ppm, appelées ici  $C_\beta$  et (d) les résonances des  $C_{\beta-\gamma}$  ayant un déplacement chimique inférieur à 20 ppm, appelées ici  $CH_3$  de YajG à 60 kHz de vitesse de rotation. Les courbes de signal sur bruit ont été mesurées pour les expériences de polarisation croisée (vert), d'excitation directe large bande (bleu), et d'excitation sélective (rouge). Les expériences ont été enregistrées comme indiqué sur la Figure 5-16.

Nous supposons que cela est dû à deux raisons : (1) les composantes longues des constantes de temps sélectives sont dans ce cas très proches voire moins importantes que les constantes de temps du proton et (2) la mobilité de ces spins entraîne une très mauvaise efficacité du transfert CPMAS. Le signal sur bruit des expériences d'excitation est au moins deux fois plus important que celui des expériences CPMAS. Dans le cas des  $CH_3$ , le signal sur bruit des expériences d'excitation directe sélective est même jusqu'à 30 % plus important que celui d'une expérience d'excitation directe large bande. Nous pensons que cela est dû à un effet nOe, causé par la mobilité des chaînes latérales et par la période de découplage. Lors de l'étude des carbones aliphatiques de pro-

téines n'étant pas dopées aux ions paramagnétiques, il peut donc être intéressant à très haute vitesse de rotation de manipuler sélectivement les carbones très mobiles afin d'augmenter la sensibilité de l'expérience. Il serait notamment intéressant d'implémenter ce phénomène dans des expériences multidimensionnelles.

### 5.3 Conclusion

Lors de cette étude, nous avons pu démontrer que l'utilisation d'impulsions sélectives sur la voie carbone sur des échantillons enrichis en carbone  $^{13}$  permet d'accélérer le retour à l'équilibre de l'aimantation du spin excité. Cette accélération est due principalement à un mécanisme de diffusion de spin entre les carbones non excités à l'équilibre et le carbone sélectivement excité. Cette diffusion de spin a lieu dans un laps de temps inférieur à 100 ms. Bien que les couplages dipolaires soient mieux moyennés à haute vitesse de rotation à l'angle magique, ce qui est censé limiter la diffusion de spin, l'accélération du retour à l'équilibre de l'aimantation est toujours significative pour des vitesses de rotation pouvant atteindre 30 kHz. Le retour à l'équilibre de l'aimantation observé après excitation sélective des carbones est suffisamment rapide pour que cette expérience soit capable de concurrencer la polarisation croisée pour des temps de répétition de l'expérience assez courts. Dans le cas des solides cristallins, le gain théorique en sensibilité n'a cependant pas pu être atteint expérimentalement à cause de la dépolarisation du bain de carbones à l'équilibre lorsque le temps de répétition de l'expérience devient beaucoup plus court que les constantes de relaxation longitudinales non sélectives des carbones. Cet effet a également été observé pour des temps de répétition de l'ordre de 300 ms dans les échantillons de protéines hydratées, qui présentent cependant des constantes de temps de relaxation beaucoup plus courtes. Ainsi, en se basant sur les constantes de temps de relaxation mesurées sur YajG à 30 kHz de vitesse de rotation, il nous a été possible de prédire que la sensibilité des expériences basées sur des impulsions sélectives pourrait être augmentée de 20 à 45 % par rapport à celle des expériences de polarisation croisée, pour un temps de répétition de 200 à 300 ms. Cependant, ce résultat ne peut pas être généralisé. En effet, l'étude d'un deuxième échantillon de protéine dans les mêmes conditions mais possédant un taux d'hydratation différent nous a montré que le signal sur bruit d'une expérience de CP pouvait dans ce régime surpasser celui d'expériences d'excitation sélective. Pour que cette dernière expérience soit plus sensible que la CP, il semble que

l'échantillon doit répondre à la condition suivante : les constantes de temps des protons doivent être supérieures aux constantes de temps sélectives des carbones.

Nous avons aussi comparé notre méthode à celle proposée par Glaubitz *et al.* et montré que les deux apportaient un gain en sensibilité équivalent, malgré l'utilisation d'une étape de polarisation croisée dans la séquence RE-LOAD. Enfin, comme les techniques rapides ne peuvent être utilisées à des vitesses de rotation à l'angle magique inférieures à 30 kHz sans compromettre la résolution de l'expérience, nous souhaitons utiliser l'effet apporté par les impulsions sélectives sur la sensibilité des expériences dans le régime « ultrafast », dans le but de développer des séquences multidimensionnelles rapides. Cependant, nous avons été pour l'instant limités par deux phénomènes : (1) la diffusion de spin n'est plus assez efficace dans ce régime, (2) l'ajout de recouplage actif n'a pas permis de compenser cette perte de contact entre les spins. L'amélioration de la relaxation observée après excitation sélective des carbones pourrait donc devenir intéressante lors du développement de méthodes de RMN rapide biomoléculaire en phase solide, mais nous n'avons pour l'instant pas été capables d'implémenter cet effet dans des séquences multidimensionnelles, quelle que soit la vitesse de rotation. Le développement de nouveaux blocs de recouplage dans le régime « ultrafast » pourrait résoudre ce problème.

Nous avons également envisagé de combiner d'autres blocs de recouplage telles que CMRR<sup>269</sup> avec une séquence similaire à celle proposée par Glaubitz. Cependant, elle serait basée sur l'utilisation d'impulsions sélectives sans étape de CPMAS. Quelques scans bénéficiant du recouplage actif CMRR juste après l'acquisition seraient répétés très rapidement avant l'insertion d'un délai suffisamment long pour éviter le phénomène de saturation. Ces deux blocs seraient répétés jusqu'à obtention du signal sur bruit souhaité.

Finalement, les impulsions sélectives pourraient être utilisées dans le régime « ultrafast » dans deux situations : tout d'abord il serait possible d'exciter uniquement les carbones mobiles, ce qui permet d'augmenter la sensibilité des expériences sélectives monodimensionnelles par rapport aux expériences CPMAS. En effet, le retour à l'équilibre de ces carbones est très rapide et l'étape de CPMAS est inefficace de part leur mobilité. Enfin, un apport supplémentaire en sensibilité est apporté par un effet nOe. Ces effets pourraient être utilisés afin d'augmenter la sensibilité d'expériences bidimensionnelles ou de réduire leur temps d'acquisition. Nous pourrions également essayer d'utiliser le gain en intensité des pics de carbones très mobiles de près de

50 pourcent apporté par effet nOe lors de la manipulation sélective des autres spins. Ces deux axes de recherche sont des projets en cours au laboratoire.



## **Partie III**

**RMN en phase solide et détermination  
structurale tridimensionnelle de biomolécules**





## Chapitre 6

---

### Recouplage en RMN en phase solide



## 6. Recouplage en RMN en phase solide

Depuis la détermination de la première structure tridimensionnelle d'une protéine microcristalline en 2002 par RMN en phase solide <sup>27</sup>, cette technique a permis l'étude de systèmes biomoléculaires de plus en plus complexes et possédant une taille de plus en plus importante tels que les protéines microcristallines (jusqu'à 17,6 kDa) <sup>30, 172, 270-278</sup>, les protéines membranaires <sup>29, 279-289</sup> et les fibrilles impliquées dans les maladies dégénératives comme Alzheimer et Parkinson <sup>28, 290-293</sup>.

Ces études ont été rendues possibles par les multiples avancées méthodologiques mais aussi technologiques qu'a connues la RMN en phase solide ces dernières décennies. En 1959, le Professeur Raymond Andrew et ses collaborateurs ont notamment proposé de faire tourner l'échantillon autour d'un axe incliné à « l'angle magique » par rapport au champ magnétique principal  $B_0$ . Une telle rotation entraîne un moyennage spatiale des interactions telles que les interactions dipolaires, l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et les interactions quadripolaires <sup>20</sup>. Plus précisément, les interactions dipolaires et le CSA sont proportionnels à  $(3 \times \cos^2 \theta - 1)$ ,  $\theta$  étant l'angle entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique principal. En réglant  $\theta = \theta_m = 54,7$  degrés, il est possible de significativement réduire ces couplages et par conséquent d'accéder à des conditions de haute résolution. Cette haute résolution est nécessaire pour une caractérisation avancée à l'échelle atomique des molécules étudiées.

Cependant, l'étude structurale de tels systèmes nécessite l'obtention d'informations portant sur la distance ou sur les angles dièdres entre les atomes de la biomolécule. Ce type d'informations est typiquement obtenu en RMN grâce à des expériences permettant l'échange de polarisation entre les spins. Ces contraintes sont alors utilisées pour le calcul de la structure tridimensionnelle de la molécule d'intérêt. L'échange de polarisation entre les spins peut utiliser a priori chacune des interactions inter-spin présentes dans le système. Cependant, les interactions scalaires ne permettent de transférer de l'aimantation qu'à travers les liaisons covalentes. Ces interactions ne contiennent donc pas d'informations structurales à longue distance et sont plutôt utilisées lors de l'attribution de la molécule étudiée. L'intensité des interactions dipolaires entre deux spins, quant à elle, dépend de la distance à travers l'espace entre les deux noyaux concernés et permet donc la détermination de contraintes structurales.

Cependant, lors de la rotation à l'angle magique de l'échantillon, les informations structurales provenant du couplage dipolaire sont perdues au profit

de la résolution. Il est donc nécessaire de réintroduire les interactions dipôles-dipôles de manière contrôlée en appliquant des impulsions rf et donc en créant des séquences dites de recouplage.

Dans la première partie de ce chapitre, nous verrons quelles sont les distances interatomiques accessibles par RMN en phase solide via les techniques de recouplage et quelle sont celles qui présentent un intérêt lors de la détermination structurale de la molécule étudiée. Nous verrons ensuite quelles sont les difficultés liées à leur détection. Finalement, nous décrirons les techniques de recouplage existantes en RMN biomoléculaire, d'abord entre deux atomes identiques (recouplage homonucléaire) puis entre deux hétéronoyaux différents (recouplage hétéronucléaire).

## 6.1 Mesure de distances internucléaires par RMN en phase solide

Les atomes d'hydrogène possèdent trois avantages : (1) ils sont présents en grand nombre dans les échantillons biomoléculaires, (2) leur abondance naturelle est de 99,985 pourcent et (3) ils possèdent une bonne sensibilité de détection. Ces caractéristiques expliquent pourquoi ils sont très couramment détectés en RMN des solutions. Cependant, en RMN en phase solide, les spectres de résonance du proton sont en général constitués de résonances très élargies, dominées par les fortes interactions dipolaires proton-proton. Bien que quelques groupes de recherche aient fait d'énormes progrès en détection proton <sup>294-296</sup>, les atomes détectés habituellement en RMN biomoléculaire sont souvent le carbone et l'azote. Dans ce cas, les interactions détectées ont lieu entre des carbones ou des azotes (recouplage homonucléaire) ou entre des azotes et des carbones (recouplage hétéronucléaire).

### 6.1.1 Les différentes classes de distances

En RMN des solutions, les distances détectées sont souvent classées de la façon suivante : les contacts à courte distance ont lieu entre des atomes appartenant au même résidu. Les contacts à moyenne distance impliquent des atomes appartenant à des acides aminés distants de deux à quatre résidus. Enfin, les contacts à longue distance ont lieu entre des spins appartenant à des acides aminés séparés d'au moins quatre résidus.

Dans la suite de ce chapitre, nous préférons utiliser la classification suivante : les contacts à courte distance font intervenir des atomes distants de

1,5 Å environ, soit des distances correspondant à une liaison covalente entre deux atomes. La détection de ces distances est intéressante lors de l'attribution de la biomolécule d'intérêt. Les contacts à moyenne distance sont détectés entre des spins distants de 2 à 4 Å et les contacts à longue distance mettent en jeu des spins distants de plus de 4 Å. Ces deux types de contacts sont ceux nécessaires à la détermination de la structure tridimensionnelle du biopolymère étudié. Sur la Figure 6-1 sont représentées les différentes classes de distances que nous utilisons. Prenons l'exemple du contact à moyenne distance représenté sur la figure (en violet). Ce contact implique des atomes distants de 28 résidus dans la protéine. Il appartiendrait donc à la catégorie des contacts à longue distance selon la classification utilisée en RMN des solutions, tout comme le contact représenté en vert, qui est classifié comme longue distance selon les codes de la RMN des solutions. Notre classification nous paraît donc plus appropriée car elle permet de rendre compte de la distance entre les spins et donc de la difficulté à détecter les interactions. En effet, la détection des contacts à longue distance dans des échantillons complètement marqués est rendue très difficile par le phénomène de troncature dipolaire.

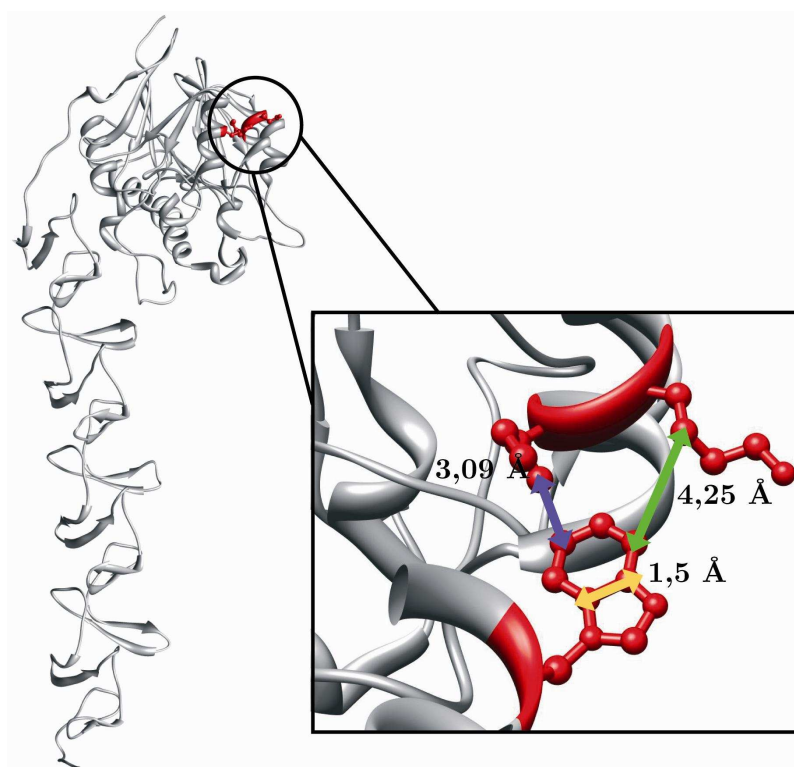


Figure 6-1. Types de distances détectables en RMN en phase solide grâce aux différentes séquences de recouplage. Ces distances sont illustrées sur l'isoleucine 241, la lysine 242 et le tryptophane 269, en rouge, de la structure tridimensionnelle de la protéine CBPE<sup>156, 158</sup>. Les courtes distances sont représentées par la flèche jaune, les moyennes distances par la flèche violette et les longues distances par la flèche verte.

## 6.1.2 La troncature dipolaire

La troncature dipolaire peut être illustrée de deux façons. D'un point de vue mathématique, ce phénomène est décrit par le fait que les termes constituant l'hamiltonien de recouplage ne commutent pas, entraînant une domination des couplages les plus forts ou encore une troncature des termes les plus faibles <sup>297</sup>. D'un point de vue expérimental, lors du phénomène de troncature dipolaire, le transfert de polarisation dû à des couplages dipolaires peu intenses, caractéristiques de longues distances, est très atténué par la présence d'interactions dipolaires plus importantes, caractéristiques de courtes distances

298, 299.

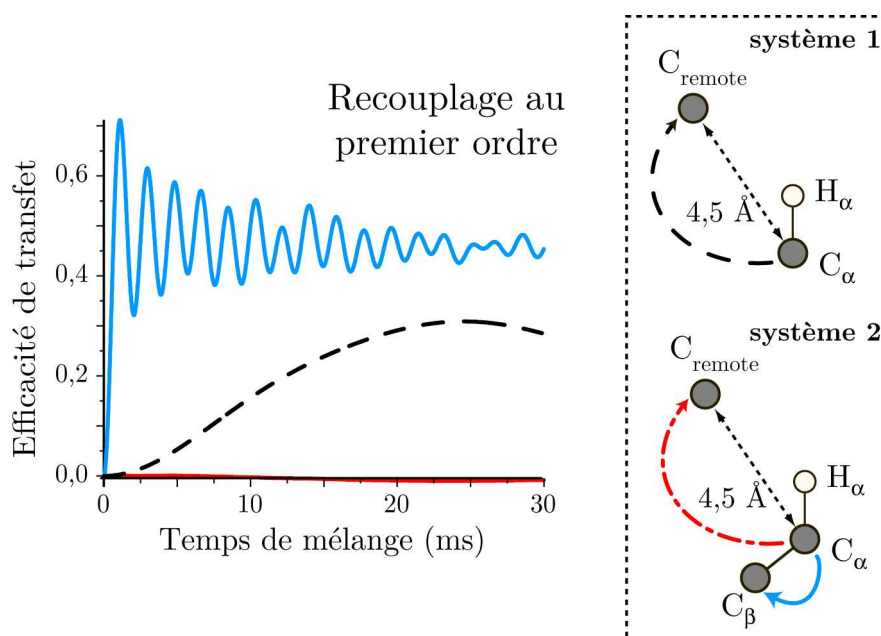


Figure 6-2. Troncature dipolaire et recouplage au premier ordre. Le premier système de spin est constitué d'un atome de carbone  $C_\alpha$  auquel est lié un  $H_\alpha$  et d'un atome situé à 4,5 Å, appelé  $C_{remote}$ . Dans le deuxième système, un atome  $C_\beta$ , directement lié au  $C_\alpha$  est également présent. Le graphe à gauche représente l'efficacité de transfert utilisant une séquence de recouplage au premier ordre en fonction du temps de mélange lors du transfert d'aimantation entre le  $C_\alpha$  et le  $C_{remote}$  dans le système 1 (en noir) et dans le système 2 (en rouge) lorsqu'un transfert de polarisation entre le  $C_\alpha$  et le  $C_\beta$  est également présent (en bleu). Figure traduite de la publication <sup>32</sup>.

Par exemple, les séquences de recouplage basées sur un mécanisme au premier ordre (RFDR <sup>300, 301</sup>, HORROR <sup>302</sup>, postC7 <sup>303</sup>, SPC5 <sup>304</sup>, CMRR <sup>269</sup>...) et dont l'hamiltonien effectif est constitué de termes qui ne commutent pas, sont sujettes à la troncature dipolaire. Ce phénomène est illustré en Figure

6-2. Des simulations de transfert d'aimantation au sein du système 1 et du système 2 ont été réalisées en utilisant un recouplage de type CMRR. La courbe noire représente le transfert entre le  $C_\alpha$  et le  $C_{\text{remote}}$  appartenant au système 1. Dans ce cas, le transfert de polarisation est significatif. Cependant, lorsqu'un  $C_\beta$ , directement lié au  $C_\alpha$  est ajouté à la simulation, le transfert de polarisation du  $C_\alpha$  au  $C_{\text{remote}}$  est annulé (courbe rouge), alors que la polarisation est très efficacement transférée au  $C_\beta$  (courbe bleue).

Ces séquences de recouplage au premier ordre sont donc très utiles à l'attribution d'échantillons biomoléculaires, la troncature dipolaire étant un frein à la détection de contacts à longue distance, nécessaires à la détermination structurale. Cependant, de nombreuses techniques ont également été mises au point afin de réduire ce phénomène. L'une de ces techniques est la préparation de l'échantillon en utilisant un marquage isotopique sélectif, qui induit une dilution du système de spins. Néanmoins, dans ce chapitre, nous ne nous intéresserons pas davantage à cette méthode mais nous nous consacrerons à la description des séquences de recouplage permettant d'atténuer le phénomène de troncature dipolaire, et ce plus particulièrement dans les échantillons uniformément marqués. Les deux prochaines parties passeront donc en revue les techniques de recouplage homonucléaire et hétéronucléaire existantes.

## 6.2 Techniques de recouplage homonucléaire

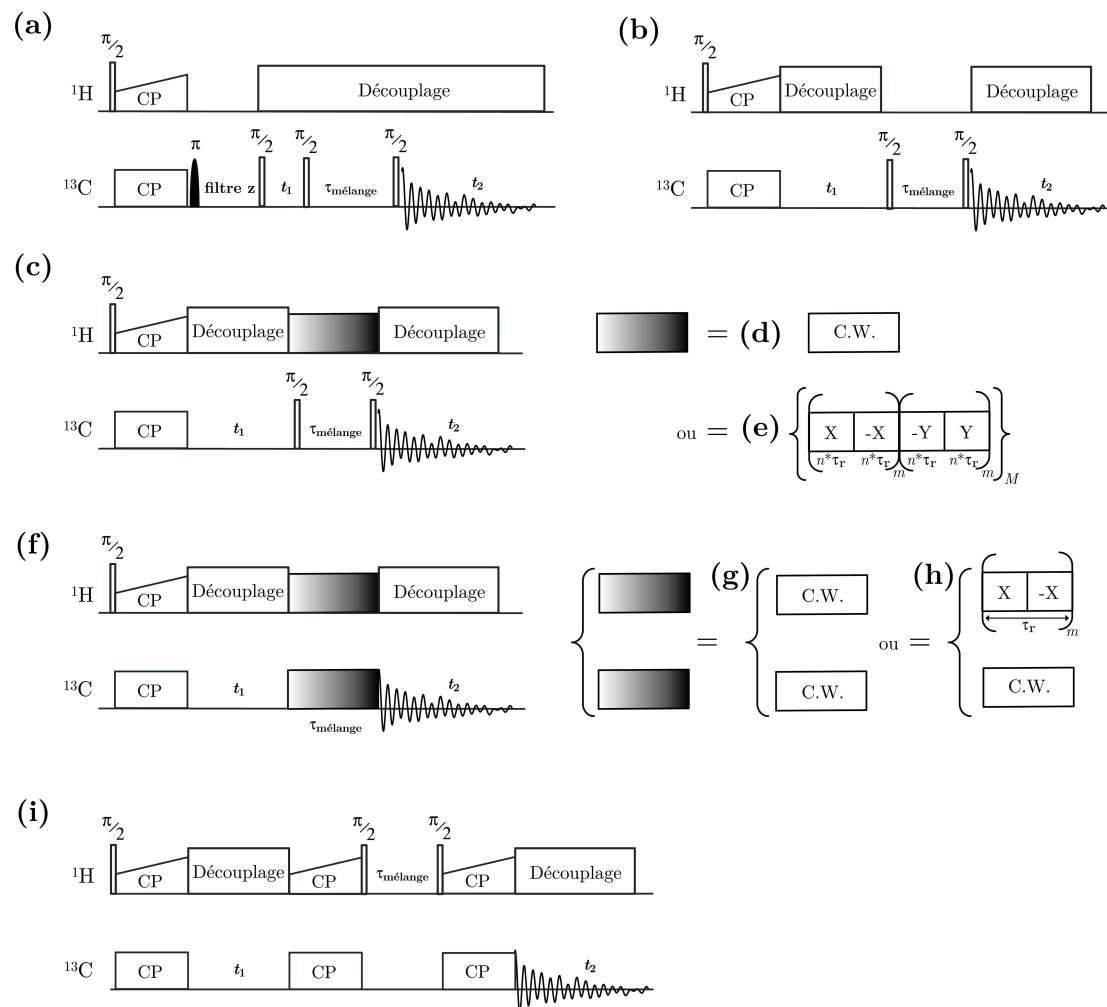
Comme nous allons le voir dans cette partie, les séquences homonucléaires permettant d'atténuer efficacement la troncature dipolaire reposent généralement sur l'un de ces deux principes : soit elles manipulent sélectivement certains spins, soit elles reposent sur un recouplage au second ordre, recouplage faisant intervenir dans l'hamiltonien effectif des termes de couplages dipolaires homonucléaires et/ou hétéronucléaires. Dans la suite de cette partie, nous allons tâcher de décrire certaines de ces techniques, et particulièrement celles qui ont permis la détermination de structures tridimensionnelles de protéines et de fibrilles.

### 6.2.1 Techniques basées sur le phénomène de « Rotational Resonance »

Dans le cas des expériences basées sur le phénomène de « Rotational Resonance » ou  $R^2$ , l'interaction dipolaire entre les membres d'une paire de spins est réintroduite sélectivement en faisant correspondre la différence de déplacement chimique entre ces deux spins avec un multiple de la vitesse de



rotation<sup>305-307</sup>. L'échange de polarisation entre les deux spins est ensuite enregistré en fonction du temps de mélange. De nombreuses variantes ont été proposées<sup>308-311</sup>. Par exemple, Costa *et al.* ont mis au point l'expérience R<sup>2</sup>W (« Rotational Resonance Width »)<sup>309</sup>, où l'échange de polarisation est enregistré en fonction de la vitesse de rotation, pour un temps de mélange constant. Cette méthode est moins dépendante des paramètres de relaxation. Elle est illustrée sur la Figure 6-3 (a).



**Figure 6-3. Séquences de recouplage homonucléaire.** Séquences (a) R<sup>2</sup>W<sup>309</sup>, (b) PDSD<sup>312</sup>, (c) séquence permettant de réaliser les expériences (d) DARR/RAD<sup>267, 268, 313</sup> ou MIRROR<sup>265</sup> et (e) PARIS-xy<sup>314</sup>, (f) séquence permettant d'effectuer les expériences (g) PAR<sup>32</sup> et (h) RESORT<sup>315</sup> et (i) séquence CHHC<sup>170</sup>.

La conséquence directe de la sélectivité de ces méthodes est que la troncature dipolaire est significativement atténuée. L'autre avantage de ces techniques est qu'elles permettent de mesurer de manière précise les distances entre les spins<sup>316, 317</sup>. Cependant, leur application à une protéine uniformément

marquée est rendue plus difficile par la présence d'interactions multi-spins, même si elle a été démontrée avec succès en 2008 sur la protéine GB1 sélectivement marquée (6 kDa) et a permis la détermination de sa structure en combinaison avec des contraintes obtenues par PDSD <sup>318</sup>.

### 6.2.2 La séquence PDSD

La méthode PDSD (« Proton Driven Spin Diffusion ») est la plus couramment employée parmi les techniques de recouplage au second ordre en vue de l'obtention de contraintes en RMN biomoléculaire. La séquence PDSD, représentée en Figure 6-3 (b), permet l'échange de polarisation entre les spins après restauration de l'aimantation le long de l'axe  $Z$  <sup>312</sup>. Le transfert d'aimantation a lieu sans condition particulière, le couplage au bain de protons fournissant l'énergie nécessaire au transfert. L'hamiltonien effectif correspondant comprend des termes au second ordre entre les couplages dipolaires hétéronucléaire et homonucléaire de type  $^1\text{H}-^{13}\text{C} \times ^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}-^{13}\text{C} \times ^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ , qui permettent le transfert d'aimantation dans un laps de temps compris entre plusieurs centaines de millisecondes à la seconde. L'existence de contacts entre spins distants a été prouvée expérimentalement mais il est beaucoup plus difficile de montrer que le transfert de polarisation est direct et non relayé (dans les échantillons uniformément marqués tout du moins) <sup>319</sup>. La PDSD a permis la détermination de la première structure tridimensionnelle de protéine en RMN en phase solide en 2002 <sup>27</sup> (SH3 sélectivement marquée, 7 kDa). Plus récemment, elle a permis la détermination de la structure de l'ubiquitine (9 kDa) uniformément marquée <sup>273</sup> mais aussi des fibrilles HET-s (5×8,6 kDa) <sup>293</sup> et de la protéine MMP12 (17,6 kDa) <sup>30</sup>, en combinaison avec d'autres techniques de recouplage. Cependant, cette méthode reposant sur la diffusion de spins n'est plus efficace lorsqu'elle est utilisée à de hauts champs magnétiques et à de hautes vitesses de rotation.

### 6.2.3 La séquence DARR/RAD

Les méthodes DARR (« Dipolar Assisted Rotational Resonance ») <sup>268, 313</sup>/ RAD (« Rf Assisted Diffusion ») <sup>267</sup> permettent d'accélérer la diffusion de spin intervenant dans les expériences PDSD et donc le transfert d'aimantation entre les spins, qui peut avoir lieu en moins de 500 millisecondes. Pour ce faire, la séquence utilise un champ rf continu sur la voie proton ayant une amplitude correspondant à la vitesse de rotation, soit en se plaçant sur les conditions résonantes de « Rotary Resonance Recoupling »  $R^3$  <sup>320</sup>. La séquence

est illustrée sur la Figure 6-3 (c)-(d). Cette technique de recouplage au second ordre utilise les mêmes termes croisés que la PDSO. L'utilité de la séquence DARR pour la détermination de structures a été démontrée sur les protéines ubiquitine (9 kDa)<sup>276</sup>, GB1 (6 kDa)<sup>271</sup>, Crh (2×10,4 kDa)<sup>172</sup> et MMP12 (17,6 kDa)<sup>30</sup>. Cette méthode, tout comme la séquence PDSO, reste tout de même très inefficace pour de hautes vitesses de rotation et de hauts champs magnétiques. Ceci tient au fait que le terme de couplage effectif est proportionnel à l'inverse de la vitesse de rotation.

#### 6.2.4 La séquence DONER

L'efficacité des méthodes PDSO et DARR est très affectée lors de leur utilisation sur des échantillons fortement enrichis en deutérium, le couplage au bain de protons étant amoindri. L'idée de la séquence DONER (« DOuble-Nucleus Enhanced Recoupling ») est d'utiliser à la fois le réseau de couplages dipolaires proton et deutérium<sup>321</sup>, et non uniquement le réseau de protons, comme dans la séquence DARR. Ceci est rendu possible par une irradiation simultanée sur les canaux proton et deutérium à la condition  $R^3$  (comme dans la séquence DARR). Cette séquence permet d'améliorer l'efficacité de transfert dans les protéines deutérées par exemple.

#### 6.2.5 La séquence PARIS

La méthode PARIS (« Phase-Alternated Recoupling Irradiation Scheme ») permet un échange de polarisation entre les atomes de carbones, tout comme les techniques PDSO et DARR<sup>322</sup>. La séquence est constituée d'un champ rf  $\omega_H$  ayant une amplitude constante modérée appliqué uniquement sur le canal proton. Cependant, la phase est inversée de  $X$  à  $-X$  après un délai  $n \times \tau$ , où  $\tau$  est la période de rotation du rotor. Il n'y a pas d'irradiation sur la voie carbone. Contrairement à la méthode DARR, le champ appliqué sur la voie proton ne répond pas nécessairement à la condition  $R^3$ . La séquence PARIS transfère plus efficacement l'aimantation que la séquence DARR et semble moins sensible à l'inhomogénéité rf. Cette séquence a été appliquée à la protéine Crh<sup>323</sup>. Dans les conditions de l'expérience, très peu de contacts à longue distance ont pu être détectés. Cependant, les auteurs supposent que, tout comme DARR, cette séquence devrait être capable de détecter de telles distances, en allongeant le temps de mélange.

Les auteurs ont également développé une variante de la séquence PARIS, appelée PARIS-xy pour « phase-alternated recoupling irradiation scheme

using orthogonal radio-frequency phases »<sup>314</sup>. Cette fois, la phase de l'irradiation sur la voie proton varie de la façon suivante :  $X$ ,  $-X$ ,  $-Y$ ,  $Y$  (Cf. Figure 6-3 (c)-(e)). Cette méthode semble plus adaptée au régime « ultra-fast », où la vitesse de rotation à l'angle magique est supérieure à 40 kHz<sup>24, 25</sup>. Elle n'a cependant été testée que sur des acides aminés.

### 6.2.6 La séquence *MIRROR*

La séquence *MIRROR* (« *MI*xed *RO*tational and *RO*tary Resonance ») est constituée d'une unique irradiation rf sur le champ proton dont l'amplitude correspond à la différence de déplacement chimique isotrope entre les spins à recoupler<sup>265</sup> (Cf. Figure 6-3 (c) et (d)). De ce fait, la séquence *MIRROR* est intrinsèquement sélective, ce qui permet d'atténuer le phénomène de troncature dipolaire. A ces conditions résonantes, l'hamiltonien effectif de recouplage au second ordre contient des termes croisés entre les couplages dipolaires homonucléaire et hétéronucléaire. Cet hamiltonien permet notamment le transfert de polarisation *ZQ* homonucléaire. Dans le but de rendre la séquence large bande, il a été proposé de remplacer l'irradiation CW sur le canal proton par une irradiation rampée ou en dents de scie. La séquence semble pouvoir induire un transfert d'aimantation à de hautes vitesses de rotation (40 kHz dans la publication) mais le temps de mélange est assez long (de l'ordre de quelques centaines de millisecondes). La capacité de la séquence à détecter des contacts à longue distance est à l'étude.

### 6.2.7 La séquence *PAR*

La séquence *PAR* (« *Pro*ton *Ass*isted *Rec*oupling ») est illustrée sur la Figure 6-3 (f) et (g). Elle est constituée cette fois-ci de deux champs CW simultanés sur les canaux proton et carbone/azote<sup>32, 324</sup>. Cette méthode est basée sur un mécanisme au second ordre *TSAR* (« *Th*ird *S*pin *Ass*isted *Rec*oupling ») qui connecte deux spins A et B via un terme croisé  $A-^1H \times ^1H-B$  impliquant un troisième spin assistant, qui est souvent un proton. Le mécanisme de recouplage *TSAR* a été le premier à utiliser ce terme croisé. Bien que les protons soient impliqués dans le mécanisme, la polarisation n'est pas transférée à travers le réseau de protons en utilisant les couplages  $^1H-^1H$ , comme cela est le cas dans les expériences *CHHC/NHHN* par exemple (Cf. paragraphe 6.2.9). Le mécanisme de recouplage *TSAR* est atténué par la présence de termes appelés « termes auto-croisés ». Afin de maximiser le transfert d'aimantation, il convient d'appliquer des champs rf à des puissances minimi-

sant ces termes. La mise en place de cette séquence est son principal désavantage : en effet, les conditions de champs rf conduisant à un recouplage TSAR sont assez précises. Plus de détails à propos des séquences reposant sur le mécanisme TSAR ainsi que sur la façon dont sont choisis les champs rf sont donnés dans le chapitre suivant.

Parce que le rapport des interactions à longue distance sur les interactions à courte distance est plus favorable que dans le cas des séquences au premier ordre, la séquence PAR permet d'atténuer le phénomène de troncature dipolaire. Il a été montré qu'elle permet ainsi la détection de contacts entre des spins distants de plus de 5 Å<sup>32</sup>. Il a été également démontré que cette séquence fonctionne parfaitement même dans le régime « ultrafast »<sup>325</sup>, où la vitesse de rotation peut atteindre 60 kHz<sup>24, 25</sup>, contrairement aux séquences PDSD et DARR. Enfin, de part les couplages dipolaires mis en jeu (et notamment l'absence de couplage dipolaire carbone-carbone), le transfert d'aimantation est moins relayé que dans les séquences basées sur la diffusion de spin. La séquence PAR a ainsi été impliquée dans la détermination structurale de MMP12<sup>30</sup>.

Il est important de remarquer cependant que contrairement aux techniques basées sur le mécanisme R<sup>2</sup>, la méthode PAR, tout comme toutes les autres séquences de recouplage présentées dans cette partie, ne permet pas de mesurer de façon précise la distance entre deux spins, mais permet de catégoriser les interactions détectées.

#### 6.2.8 La séquence RESORT

La séquence RESORT (« REsonant Second-ORder Transfer ») est très proche de la séquence PAR sauf que l'irradiation CW sur le canal proton est remplacée par une irradiation dont la phase change (Cf. Figure 6-3 (f) et (h))<sup>315</sup>. Sa fréquence de modulation est un multiple entier de la vitesse de rotation. L'hamiltonien effectif permettant le transfert d'aimantation est identique à celui de la séquence PAR sauf que l'effet RESORT apparaît à des conditions résonantes. Ce mécanisme est donc également influencé par la présence de termes auto-croisés. Des contacts à longue distance ont été détectés sur la protéine ubiquitine (9 kDa).

### 6.2.9 Les séquences CHHC/NHHN

Les séquences CHHC/NHHN diffèrent des méthodes décrites jusque maintenant puisqu'elles permettent d'observer des contacts proton-proton via une détection indirecte sur la voie carbone ou azote <sup>170, 326</sup>. Cette méthode résout le problème du manque de dispersion et de résolution de la dimension proton. Les contacts  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  sont établis par un mélange longitudinal ZQ de type PDSD, un mélange ZQ de type RFDR ou par un transfert de polarisation DQ post-C7. La première de ces séquences est représentée sur la Figure 6-3 (i). La séquence CHHC, bien que tirant profit des nombreux contacts proton-proton présents dans un échantillon biomoléculaire, souffre d'une pauvre sensibilité, notamment à cause des étapes de polarisation croisée. Les méthodes CHHC et NHHN ont cependant rendu possible la détermination structurale de la protéine kalitoxine (4 kDa) <sup>272</sup> et de Crh (2×10,4 kDa) <sup>172</sup> mais ont aussi contribué à la détermination structurale de GB1 (6 kDa) <sup>271</sup>, MMP12 (17,6 kDa) <sup>30</sup> et des fibrilles HET-s (5×8,6 kDa) <sup>293</sup>.

Afin de détecter des contacts à longue distance, de nombreuses autres idées que nous n'avons pas détaillées ont émergé ces dernières années, en particulier le recouplage stochastique proposé par Tycko <sup>327</sup>, le recouplage dipolaire tronqué de Levitt <sup>328</sup> et les techniques basées sur un triple champ oscillant de Khaneja et Nielsen <sup>329</sup>. Ces techniques ont été démontrées sur de petites molécules mais doivent encore faire leur preuve sur des échantillons de biopolymères tels que les protéines.

De plus, les avancées techniques en RMN en phase solide, et plus particulièrement celles concernant les sondes, permettent d'atteindre le régime « ultrafast ». Cependant, les techniques de recouplage homonucléaire existantes ont été développées pour de plus basses vitesses de rotation. Les méthodes de recouplage efficaces à hautes vitesses commencent à peine à se développer et il est à croire que ce nouveau régime verra apparaître de nouvelles séquences de recouplage.

## 6.3 Techniques de recouplage hétéronucléaire

Tout comme pour le recouplage homonucléaire, de nombreuses séquences ont été mises au point afin de transférer de l'aimantation entre hétéronoyaux, qui sont souvent des atomes d'azote et de carbone dans les biopolymères. Dans cette partie, nous décrirons certaines de ces méthodes et verrons

quelles sont leurs avantages et inconvénients vis-à-vis de la détection de contacts à longue distance et donc de la détermination structurale de biomolécules.

### 6.3.1 La séquence de double polarisation croisée et ses variantes

La séquence appelée « double polarisation croisée » ou plus communément DCP (pour « Double Cross Polarization ») est représentée sur la Figure 6-4 (c) dans sa version la plus simple. Elle est constituée de trois champs CW appliqués simultanément sur les canaux protons, carbone et azote. Les valeurs des champs appliqués sur ces deux derniers canaux doivent respecter les conditions de Hartmann et Hahn pendant que la valeur du champ sur la voie proton doit être au moins trois fois supérieure aux deux précédentes <sup>22</sup>. De nombreuses variantes de cette méthode ont été mises au point afin d'améliorer l'efficacité de transfert, de rendre la séquence large bande même pour de hautes vitesses de rotation, ou de la rendre spécifiquement sélective (SPICP <sup>164</sup>, RFDRCP <sup>330</sup>, APHHCP <sup>126</sup>, SPECIFIC-CP <sup>331</sup>, séquences de Hartmann-Hahn généralisées <sup>332</sup>, iDCP <sup>161</sup> ...).

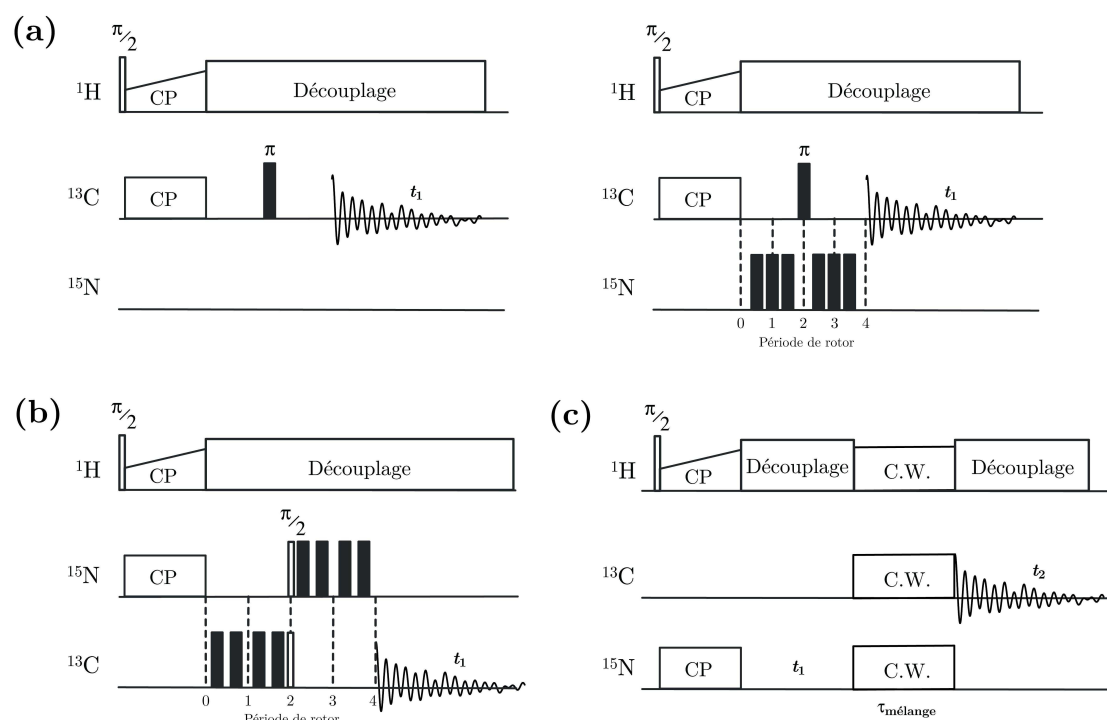
Cependant, l'hamiltonien effectif permettant le transfert d'aimantation entre les spins est un hamiltonien au premier ordre comprenant des termes non commutatifs. Ces séquences sont donc très sujettes à la troncature dipolaire. Elles sont principalement utilisées pour réaliser des transferts à une liaison dans le cadre de l'attribution des molécules.

### 6.3.2 La séquence REDOR et ses variantes

La mesure de distances entre des paires d'hétéronoyaux spécifiquement marqués via la séquence REDOR <sup>333</sup> (« Rotational-Echo DOuble-Resonance ») a lieu en deux temps : tout d'abord le signal est enregistré en utilisant la séquence présentée en Figure 6-4 (a), panneau de gauche. Dans ce cas, les couplages dipolaires hétéronucléaires  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  sont moyennés à zéro après une période de rotation du rotor. Ils n'ont donc pas d'effet sur le signal détecté sur la voie carbone. Dans un second temps, le signal est enregistré en utilisant la séquence illustrée en Figure 6-4 (a), panneau de droite. L'ajout d'impulsions de 180 degrés synchronisées avec la vitesse de rotation permet d'inverser le signe des couplages dipolaires hétéronucléaires qui ne sont donc plus moyennés à zéro après une période de rotation. Le signal enregistré est alors atténué par la présence de ces couplages dipolaires entre hétéroatomes. La comparaison du

signal enregistré avec ces deux expériences mènent ensuite au couplage dipolaire et donc à la distance entre les hétéronoyaux.

La séquence TEDOR (« Transferred-Echo DOuble Resonance ») a été mise au point quelques années plus tard afin d'éviter l'enregistrement du bruit de fond causé par les spins à l'abondance naturelle <sup>165</sup>. Après une étape de polarisation croisée, l'aimantation évolue sous le couplage dipolaire azote-carbone grâce à l'application d'impulsions de 180 degrés synchronisées avec la rotation sur le canal carbone. L'aimantation est ensuite transférée au carbone par une étape de type INEPT. Finalement, la cohérence transférée est transformée en une aimantation carbone observable par l'application d'impulsions de 180 degrés synchronisées avec la rotation sur la voie azote (Cf. Figure 6-4 (b)). La paire de spins couplés est donc sélectionnée et séparée des spins non couplés grâce au transfert de cohérence INEPT d'un spin de la paire d'hétéronoyaux à l'autre.



**Figure 6-4. Séquences de recouplage hétéronucléaire. Séquences (a) REDOR, (b) TEDOR et (c) DCP ou PAIN-CP.**

Par la suite, de nombreuses variantes de ces deux méthodes ont été mises au point (REDOR *J*-découplé <sup>168</sup> où les couplages *J* carbone-carbone sont refocalisés, FSR (« Frequency Selective » REDOR) où les couplages dipolaires que l'on ne souhaite pas observer et les couplages scalaires sont supprimés <sup>167</sup>, REPT (« REcoupled Polarization-Transfer ») <sup>169</sup>, 3D ZF- et BASE-TEDOR (3D « z-filtered » TEDOR et 3D « band-selective » TEDOR) <sup>166</sup>), toutes



ayant pour but de permettre la mesure de distances dans un échantillon uniformément marqué et non dans un échantillon où une paire de spins est marquée sélectivement, comme cela est le cas dans les expériences REDOR et TEDOR. En effet, dans ces deux dernières expériences, la mesure de distance dans un échantillon uniformément enrichi est compliquée par la présence des multiples interactions spin-spin.

Bien qu'elles permettent la mesure précise de longues distances, les méthodes REDOR/TEDOR et leurs variantes sont difficilement applicables à de grosses molécules uniformément marquées telles que les protéines. Cependant, ces séquences ont permis la détermination de la structure tridimensionnelle du tripeptide MLF<sup>334</sup>, d'un petit peptide formant des fibrilles<sup>28</sup> et de la protéine GB1 sélectivement marquée<sup>274</sup>.

### 6.3.3 La séquence NHHC

La séquence NHHC est l'équivalent des séquences CHHC/NHHN mais appliqué à deux hétéronoyaux différents<sup>170</sup>. Elle possède les mêmes avantages et inconvénients. Elle a cependant été utilisée dans la détermination structurale de Crh<sup>171, 172</sup>.

### 6.3.4 La séquence PAIN-CP

La séquence PAIN-CP (« Proton Assisted Insensitive Nuclei Cross Polarization ») est l'équivalent de la séquence PAR mais appliquée au recouplage hétéronucléaire<sup>33, 34</sup>. Elle est constituée d'une triple irradiation simultanée CW sur les trois canaux proton, carbone et azote (Cf. Figure 6-4 (c)). Cette séquence présente les mêmes avantages et inconvénients que son pendant PAR. Elle permet notamment la détection de contacts à longue distance. Elle a été impliquée dans la détermination structurale de MMP12 (17,6 kDa)<sup>30</sup> et a permis la mise en évidence de contacts à longue distance intermonomériques dans le dimère de Crh<sup>33</sup>. Plus de détails seront donnés sur les techniques PAR et PAIN-CP dans le chapitre suivant.

## 6.4 Conclusion

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, la troncature dipolaire est un frein à la détection de contacts à longue distance et rend la détermination de structures tridimensionnelles très difficile.

Cependant, des séquences de recouplage homonucléaires et hétéronucléaires qui permettent la détection de contacts à longue distance ont été développées. Parmi celles-ci les séquences basées sur le mécanisme TSAR, les séquences PAR et PAIN-CP, ont été impliquées dans la détermination structurale de plusieurs protéines et possèdent l'avantage d'être efficaces dans le régime « ultrafast ». Dans le chapitre suivant, nous verrons comment l'introduction d'un changement de phase au milieu de la période d'irradiation TSAR permet d'améliorer l'efficacité de transfert et de faciliter la mise en place de l'expérience.



## Chapitre 7

---

### Amélioration du mécanisme de recouplage TSAR en RMN en phase solide



## 7. Amélioration du mécanisme de recouplage TSAR en RMN en phase solide

Comme expliqué plus en détails dans le chapitre précédent, le mécanisme de recouplage TSAR (« Third Spin Assisted Recoupling ») possède l'avantage d'atténuer la troncature dipolaire. Ce mécanisme, sur lequel sont basées deux séquences, une homonucléaire (PAR<sup>32, 324</sup>) et une hétéronucléaire (PAIN-CP<sup>33, 34</sup>), permet entre autre la détection de contacts à longue distance.

Cependant, comme nous l'avons également mentionné dans le chapitre 6, l'efficacité de transfert de ces deux séquences est amoindrie par la présence de « termes auto-croisés ». Ces termes impliquent que les conditions de champs rf pour lesquelles le recouplage TSAR est actif et efficace sont très étroites et nécessitent des calibrations très précises.

Le projet relaté dans ce chapitre a pour objectif de démontrer que l'introduction d'un changement de phase de 180 degrés au milieu de la période d'irradiation CW sur tous les canaux permet d'améliorer les performances des séquences PAR et PAIN-CP. Ces nouvelles séquences, que nous appelons PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift, voient leur efficacité de transfert améliorée. Les conditions où le mécanisme TSAR est actif sont également élargies, ce qui facilite l'optimisation de ces méthodes.

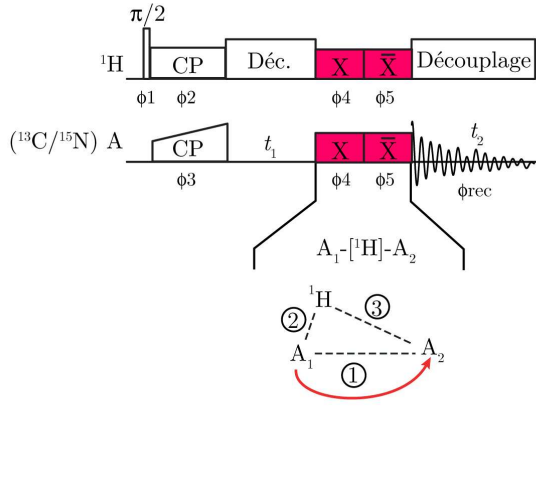
Dans un premier temps, nous décrirons la théorie du mécanisme TSAR et verrons comment l'introduction de ce changement de phase permet d'améliorer l'efficacité de transfert. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée aux simulations accomplies sur des systèmes de spins modèles. Nous verrons qu'elles confirment les résultats obtenus par la théorie. Enfin, nous relaterons comment nous avons appliqué ces nouvelles séquences au domaine biomoléculaire et plus particulièrement à une protéine de 20 kDa, YajG<sup>263</sup>. Des expériences seront présentées sur toute la plage de champs magnétiques et de vitesses de rotation accessibles aujourd'hui.

### 7.1 Théorie

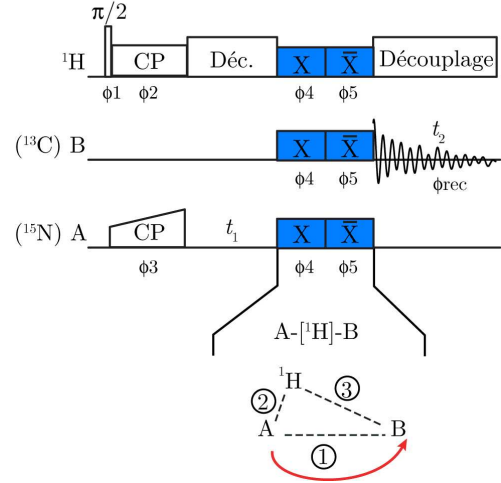
Les séquences d'impulsions PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift décrites tout le long de ce chapitre sont représentées en Figure 7-1 (a) et (b), respectivement. Après l'étape initiale de polarisation croisée et la période d'évolution  $t_1$ , une irradiation continue CW, qui constitue le bloc de recouplage TSAR, est appliquée sur tous les canaux simultanément. La phase de cette irradiation est

changée de 180 degrés en son milieu. Cette étape est suivie d'une détection des hétéronoyaux sous découplage hétéronucléaire. Les séquences PAR et PAIN-CP sont en tous points identiques sauf que la phase des irradiations CW constituant le bloc TSAR n'est pas variée. Comme nous allons le voir dans cette partie, le mécanisme TSAR est un mécanisme de recouplage du second-ordre impliquant les interactions dipolaires  $A-^1H$  et  $^1H-B$ ,  $A$  et  $B$  pouvant être des spins identiques.

(a) Cas homonucléaire



(b) Cas hétéronucléaire



**Figure 7-1.** Séquences d'impulsion (a) PAR- $\pi$ -shift et (b) PAIN-CP- $\pi$ -shift 2D. Les impulsions de 90 degrés sont représentées par les barres verticales blanches. Les cyclages de phase utilisés sont les suivants : (a)  $\Phi_1 = x$  ;  $\Phi_2 = y$  ;  $\Phi_3 = x, -x$  ;  $\Phi_4 = x, x, -x, -x$  ;  $\Phi_5 = -x, -x, x, x$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x$ . (b)  $\Phi_1 = x$  ;  $\Phi_2 = x, -x$  ;  $\Phi_3 = y$  ;  $\Phi_4 = x, x, -x, -x$  ;  $\Phi_5 = -x, -x, x, x$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x$ . Les séquences d'impulsions PAR et PAIN-CP classiques sont similaires sauf que la phase des blocs PAR et PAIN-CP est maintenue identique tout le long des irradiations.

### 7.1.1 Principes du mécanisme de recouplage TSAR

Les expériences PAR et PAIN-CP peuvent être analysées en utilisant la théorie de l'hamiltonien moyen ou AHT (« Average Hamiltonian Theory »)<sup>335</sup>. Cette théorie permet de visualiser et de comprendre la dynamique de spins intervenant dans le mécanisme TSAR dans le sous-espace PAR ou PAIN-CP. Cette analyse est décrite en détails dans la publication<sup>32</sup>. Le contenu de ce paragraphe a pour unique but de donner les éléments essentiels nécessaires à la compréhension de l'effet du changement de phase intervenant dans les expériences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift. Pour ce faire, considérons un système à trois spins constitué de 2 atomes  $A$  et  $B$  et d'un proton assistant, les

spins  $A$  et  $B$  étant identiques dans le cas de l'expérience PAR. Le système de spins est sujet à trois irradiations simultanées CW sur les canaux  $A$ ,  $B$  et proton possédant une force de champ rf  $\omega_{1A}/2\pi$ ,  $\omega_{1B}/2\pi$  and  $\omega_{1H}/2\pi$ , respectivement. Dans le cas hétéronucléaire, l'hamiltonien interne peut être écrit de la façon suivante :

$$\begin{aligned}
 H = & \underbrace{\omega_{AB} 2A_z B_z + \omega_{AH} 2A_z H_z + \omega_{HB} 2H_z B_z}_{\text{Interactions dipolaires}} \\
 & + \underbrace{\omega_A A_z + \omega_B B_z + \omega_H H_z}_{\text{Interactions Zeeman}} \\
 & + \underbrace{\omega_{1A} A_x + \omega_{1B} B_x + \omega_{1H} H_x}_{\text{Irradiations CW}}
 \end{aligned}
 \tag{Equation 7-1}$$

où  $\omega_{AB}$ ,  $\omega_{AH}$  et  $\omega_{HB}$  représentent les couplages dipolaires homonucléaires ou hétéronucléaires et  $\omega_A$ ,  $\omega_B$ , et  $\omega_H$  les tenseurs de déplacement chimique des spins  $A$ ,  $B$  et  $H$  respectivement. La rotation à l'angle magique induit une dépendance temporelle de l'anisotropie de ces interactions.

Afin de faciliter les calculs, l'hamiltonien exprimé en équation 7-1 peut être réécrit dans une base sphérique, en utilisant les tenseurs sphériques irréductibles présentés en annexe C :

$$\begin{aligned}
 H = & \underbrace{\omega_{AB} 2T_{10}^A T_{10}^B + \omega_{AH} 2T_{10}^A T_{10}^H + \omega_{HB} 2T_{10}^H T_{10}^B}_{\text{Interactions dipolaires}} \\
 & + \underbrace{\omega_A T_{10}^A + \omega_B T_{10}^B + \omega_H T_{10}^H}_{\text{Interactions Zeeman}} \\
 & + \underbrace{\omega_{1A} \left\{ \frac{-T_{11}^A + T_{1-1}^A}{\sqrt{2}} \right\} + \omega_{1B} \left\{ \frac{-T_{11}^B + T_{1-1}^B}{\sqrt{2}} \right\} + \omega_{1H} \left\{ \frac{-T_{11}^H + T_{1-1}^H}{\sqrt{2}} \right\}}_{\text{Irradiations CW}}
 \end{aligned}
 \tag{Equation 7-2}$$

Afin d'apprécier l'effet des champs rf CW, il est plus facile de réécrire l'hamiltonien dans le référentiel des interactions défini par les trois irradiations CW. A ce stade, les indices  $p$  ont été introduits afin de réduire la dépendance de l'hamiltonien à quatre fréquences différentes ( $\omega_r/2\pi$ , la fréquence de rotation du rotor et  $\omega_{1A}/2\pi$ ,  $\omega_{1B}/2\pi$  et  $\omega_{1H}/2\pi$  les forces des champs rf sur les voies  $A$ ,  $B$  et proton, respectivement) à une unique dépendance fréquentielle :



$$\omega_{1A}/2\pi = p_A \left( \omega_r/2\pi \right) \quad \text{Equation 7-3}$$

$$\omega_{1B}/2\pi = p_B \left( \omega_r/2\pi \right) \quad \text{Equation 7-4}$$

$$\omega_{1H}/2\pi = p_H \left( \omega_r/2\pi \right) \quad \text{Equation 7-5}$$

La théorie de l'hamiltonien moyen <sup>335</sup> est ensuite appliquée sur une période  $n\tau_r$  où  $\tau_r$  est une période de rotation et  $n$  est suffisamment petit pour assurer une convergence rapide. L'expression de l'hamiltonien dans le référentiel des interactions est donc :

$$\begin{aligned} \widetilde{H} = & \overbrace{\sum_{m_1=-2}^2 \sum_{\substack{q_{1A}=-1 \\ q_{1A} \neq 0}}^1 \sum_{\substack{q_{1B}=-1 \\ q_{1B} \neq 0}}^1 \omega_{AB}^{m_1} \operatorname{sgn}(q_{1A}) \operatorname{sgn}(q_{1B}) T_{1q_{1A}}^A T_{1q_{1B}}^B \exp\left\{-i(nX_1) \frac{\omega_r t}{n}\right\}}^1 \\ & + \overbrace{\sum_{m_2=-2}^2 \sum_{\substack{q_{2A}=-1 \\ q_{2A} \neq 0}}^1 \sum_{\substack{q_{2H}=-1 \\ q_{2H} \neq 0}}^1 \omega_{AH}^{m_2} \operatorname{sgn}(q_{2A}) \operatorname{sgn}(q_{2H}) T_{1q_{2A}}^A T_{1q_{2H}}^H \exp\left\{-i(nX_2) \frac{\omega_r t}{n}\right\}}^2 \\ & + \overbrace{\sum_{m_3=-2}^2 \sum_{\substack{q_{3H}=-1 \\ q_{3H} \neq 0}}^1 \sum_{\substack{q_{3B}=-1 \\ q_{3B} \neq 0}}^1 \omega_{HB}^{m_3} \operatorname{sgn}(q_{3H}) \operatorname{sgn}(q_{3B}) T_{1q_{3H}}^H T_{1q_{3B}}^B \exp\left\{-i(nX_3) \frac{\omega_r t}{n}\right\}}^3 \\ & + \overbrace{\sum_{\lambda \in \{A,B,H\}} \sum_{m=-2}^2 \sum_{\substack{q_\lambda=-1 \\ q_\lambda \neq 0}}^1 \omega_\lambda^m \left(\operatorname{sgn}(q_\lambda)/\sqrt{2}\right) T_{1q_\lambda}^\lambda \exp\left\{-i(nX_\lambda) \frac{\omega_r t}{n}\right\}}^{4+5+6} \end{aligned}$$

$$\text{Equation 7-6}$$

où nous utilisons les substitutions suivantes :

$$\begin{aligned} X_1 &= m_1 + p_A q_{1A} + p_B q_{1B} \\ X_2 &= m_2 + p_A q_{2A} + p_H q_{2H} \\ X_3 &= m_3 + p_H q_{3H} + p_B q_{3B} \\ X_\alpha &= m_\alpha + p_\alpha q_\alpha \end{aligned} \quad \text{Equation 7-7}$$

et où  $q$  est la composante des tenseurs sphériques  $T_{lq}$ ,  $m$  la composante spatiale liée à la rotation à l'angle magique,  $\operatorname{sgn}(q)$  la fonction signe de  $q$  et où  $\alpha$  représente les indices  $A$ ,  $B$  et  $H$ .

Le cas homonucléaire peut être traité exactement de la même façon sauf que le premier terme de l'équation 7-1 s'écrit  $\omega_{AB}[2A_zB_z - (A_xB_x + A_yB_y)]$ .

Il est supposé que les champs rf sont choisis de façon à éviter les conditions de Hartmann-Hahn (HH) <sup>22</sup>, où la différence ou la somme des champs rf appliqués sur deux canaux différents valent une à deux fois la valeur de la vitesse de rotation. Les conditions de recouplage R<sup>3</sup> (« Rotary Resonance Recoupling ») <sup>336</sup>, où la valeur de l'irradiation rf correspond à un multiple de la vitesse de rotation, sont également écartées. Si ces conditions bien particulières sont évitées ( $X_1 \neq 0, X_2 \neq 0, X_3 \neq 0, X_\alpha \neq 0$ ), l'hamiltonien moyen au premier ordre s'annule.

Afin de décrire le mécanisme de recouplage TSAR, il est donc nécessaire de calculer les termes au second ordre et donc entre autre le terme croisé entre le terme 2 de l'équation 7-6 correspondant au couplage dipolaire A-<sup>1</sup>H et le terme 3 de la même équation correspondant au couplage dipolaire <sup>1</sup>H-B. Dans la suite de ce travail, nous ne considérerons que le cas d'un recouplage TSAR zéro-quanta où la valeur des champs rf appliqués sur les voies A et B est la même, appelé ZQ  $\delta p_0$  TSAR. Cependant, des conditions de recouplage TSAR double-quanta sont possibles ainsi que des conditions où la différence ou la somme des valeurs de champs rf appliqués sur les voies A et B est égale à un multiple de la vitesse de rotation <sup>33</sup>. Le terme de recouplage ZQ  $\delta p_0$  TSAR est donc :

$$\tilde{H}_{ZQ, \delta p_0}^{(2), \text{TSAR}} = 2\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}} (T_{11}^A T_{1-1}^B) T_{10}^H + 2\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}*} (T_{1-1}^A T_{11}^B) T_{10}^H$$

Equation 7-8

Ce terme croisé peut à nouveau être exprimé dans une base cartésienne :

$$\tilde{H}_{ZQ, \delta p_0}^{(2), \text{TSAR}} = 2\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}} A^+ B^- H_Z + 2\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}*} A^- B^+ H_Z \quad \text{Equation 7-9}$$

Finalement, l'hamiltonien décrivant le recouplage TSAR peut être exprimé en utilisant des opérateurs de spin fictif ZQ, décrits dans l'annexe C :

$$\tilde{H}_{ZQ, \delta p_0}^{(2), \text{TSAR}} = \text{Re}(\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{X}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}} + \text{Im}(\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{Y}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}}$$

Equation 7-10

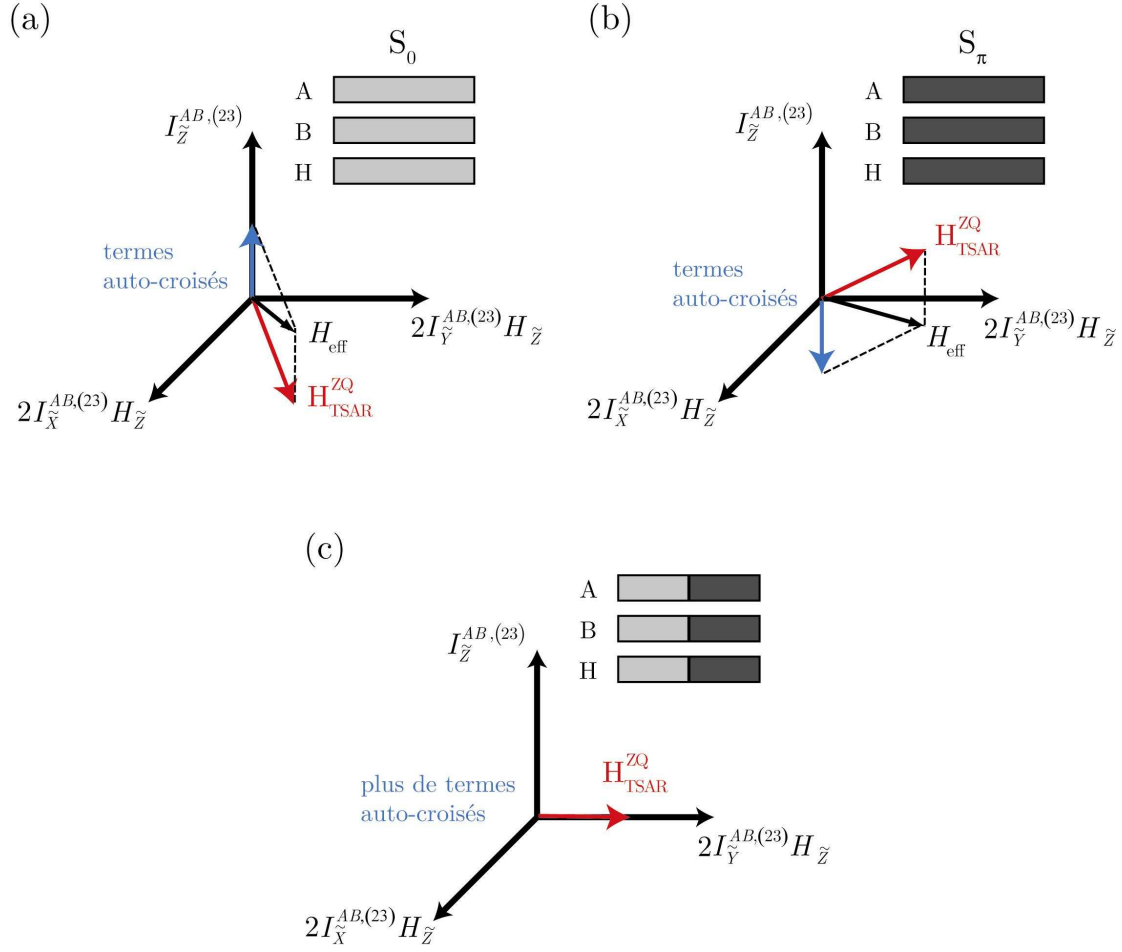
L'expression des termes de couplage TSAR  $\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}$  peut être trouvée dans l'annexe C. L'équation 7-10 nous permet de visualiser le sous-espace dans lequel a lieu le mécanisme TSAR. Le sous-espace TSAR peut être perçu comme une base couplée entre un proton assistant et un opérateur de spin fictif ZQ impliquant les spins  $A$  et  $B$  (Cf. Figure 7-2). Dans ce mécanisme, aucune aimantation n'est transférée au proton, mais les couplages dipolaires entre les spins  $A$  ou  $B$  et le proton conduisent à une inversion de la composante  $\tilde{Z}$  du spin fictif (représentant une différence d'aimantation) et peuvent donc induire un transfert de polarisation entre le spin  $A$  et le spin  $B$ .

Sur les cartes de transfert montrées plus loin et d'après la publication <sup>32</sup>, le premier terme en  $2I_{\tilde{X}}^{AB,(23)}H_{\tilde{Z}}$  contribue principalement à la zone de recouplage sélectif indiquée par le chiffre **1** ( $p_c$  est inférieur à 0,5, l'irradiation sur la voie carbone ne permettra donc pas de couvrir toute la fenêtre spectrale). Le deuxième terme en  $2I_{\tilde{Y}}^{AB,(23)}H_{\tilde{Z}}$  correspond quant à lui majoritairement à la zone en dessous de la diagonale indiquée par le chiffre **2**. Ces zones sont visibles sur la Figure 7-3.

Le terme croisé TSAR entre le terme 2 et le terme 3 de l'équation 7-6 n'est pas le seul terme croisé possible lors de la triple irradiation CW. Une description complète du mécanisme TSAR nécessite l'évaluation de ces autres termes croisés du second ordre. Ces termes sont appelés « termes auto-croisés » car ils correspondent au terme croisé entre chaque terme de l'équation 7-6 et lui-même. Ces termes possèdent une contribution non nulle le long de l'axe  $\tilde{Z}$  dans le sous-espace TSAR. Le terme effectif TSAR n'est donc pas dans le plan  $(\tilde{X}\tilde{Y})$  mais légèrement décalé par rapport à celui-ci. Il ne va donc plus pouvoir inverser aussi proprement la composante  $\tilde{Z}$  correspondant au transfert d'aimantation (Cf. Figure 7-2). L'efficacité du recouplage TSAR est donc amoindrie par ces termes auto-croisés. L'hamiltonien correspondant à ces derniers peut être écrit ainsi :

$$\tilde{H}_{\text{AUTO}}^{(2)} = \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{AB,(23)} + \omega_{DQ}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{AB,(14)} + \lambda T_{10}^H \quad \text{Equation 7-11}$$

Les expressions analytiques de  $\omega_{ZQ}^{\text{AUTO}}$  et  $\omega_{DQ}^{\text{AUTO}}$  sont données en Annexe C.



**Figure 7-2.** Visualisation de l'hamiltonien TSAR (en rouge), de l'hamiltonien effectif (en noir) et des termes auto-croisés (en bleu) dans le sous-espace TSAR quand (a) les phases des irradiations sur les canaux  $A$ ,  $B$  et proton valent 0, quand (b) les phases de ces irradiations valent  $\pi$ , et quand (c) un changement de phase de  $\pi$  est introduit au milieu de la période d'irradiations. Les barres gris clair et foncé en haut à droite de chaque sous-espace représentent la phase appliquée lors des irradiations CW sur les canaux  $A$ ,  $B$  et H.

### 7.1.2 Effet d'un changement de phase de 180 degrés sur le mécanisme TSAR

La théorie de l'hamiltonien moyen peut également servir à évaluer l'effet d'un changement de phase de 180 degrés au milieu de la période d'irradiations CW lors des expériences de types PAR et PAIN-CP. Nous avons distingué trois cas différents : (1) le changement de phase a lieu sur les trois canaux  $A$ ,  $B$  et proton, (2) le changement de phase a lieu sur les canaux  $A$  et  $B$  seulement et (3) le changement de phase a lieu sur le canal proton uniquement.

### 7.1.2.1 Changement de phase sur les trois canaux d'irradiation $A$ , $B$ et proton

L'effet d'un changement de phase de  $\pi$  des irradiations conduit à des expériences que nous appelons PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift. L'hamiltonien effectif TSAR- $\pi$ -shift peut s'écrire:

$$H_{\text{eff}} = \text{Im}(\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{Y}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}} + \underbrace{\frac{\tau}{2} \text{Re}(\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}}) \left\{ -\text{Im}(\omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}}) I_{\tilde{Z}}^{AB, (23)} + \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} 2I_{\tilde{Y}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}} \right\}}_{\text{termes correctifs}}$$

**Equation 7-12**

Le premier terme de l'équation 7-12 est le plus souvent beaucoup plus grand que les termes correctifs qui peuvent donc être négligés. L'application d'un changement de phase de  $\pi$  sur tous les canaux d'irradiations permet donc d'éliminer les termes auto-croisés et de projeter le terme TSAR le long de l'axe  $\tilde{Y}$  du sous-espace TSAR. Cet effet peut être visualisé simplement sur la Figure 7-2. Lorsque la phase des irradiations CW sur les 3 canaux vaut zéro, l'hamiltonien TSAR est dans le plan  $(\tilde{X} \tilde{Y})$  et les termes auto-croisés le long de l'axe  $\tilde{Z}$  du sous-espace TSAR (Cf. Figure 7-2 (a)). Lorsque la phase des irradiations CW vaut  $\pi$ , l'hamiltonien TSAR est dans le plan  $(-\tilde{X} \tilde{Y})$  et les termes auto-croisés le long de l'axe  $-\tilde{Z}$  du sous-espace TSAR (Cf. Figure 7-2 (b)). Il en découle que lorsque un changement de phase de  $\pi$  des irradiations est introduit au milieu de la période TSAR, les termes auto-croisés s'annulent et l'hamiltonien TSAR est projeté le long de l'axe  $\tilde{Y}$  dans le sous-espace TSAR (Cf. Figure 7-2 (c)).

En comparant les équations 7-10 et 7-12, il semblerait donc que l'introduction de ce changement de phase sur les trois canaux élimine le terme TSAR dominé par  $2I_{\tilde{X}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}}$  apparaissant à de bas champs rf sur les cartes de transfert (zone **1**) et privilégie la condition sous la diagonale dominée par  $2I_{\tilde{Y}}^{AB, (23)} H_{\tilde{Z}}$  (zone **2**).

### 7.1.2.2 Changement de phase sur les canaux d'irradiation A et B

L'hamiltonien effectif TSAR résultant du changement de phase des irradiations ayant lieu sur les canaux  $A$  et  $B$  peut s'écrire ainsi :

$$H_{\text{eff}} = \text{Re}(\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{X}}^{AB,(23)} H_{\tilde{Z}} + \underbrace{\frac{\tau}{2} \text{Im}(\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}) \left\{ \text{Re}(\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}) I_{\tilde{Z}}^{AB,(23)} - \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} 2I_{\tilde{Y}}^{AB,(23)} H_{\tilde{Z}} \right\}}_{\text{termes correctifs}} + \lambda T_{10}^H$$

**Equation 7-13**

Le premier terme de l'équation 7-13 est encore une fois beaucoup plus grand que les termes correctifs, qui peuvent donc être négligés. L'application d'un changement de phase de  $\pi$  sur les canaux d'irradiations  $A$  et  $B$  permet donc d'éliminer les termes auto-croisés et de projeter le terme TSAR le long de l'axe  $\tilde{X}$  du sous-espace TSAR.

Cette fois-ci, le changement de phase a un effet inverse sur le mécanisme TSAR. La comparaison des équations 7-10 et 7-13 nous apprend que l'introduction de ce changement de phase sur les canaux  $A$  et  $B$  uniquement élimine le terme TSAR apparaissant sous la diagonale (zone **2**) et privilégie la condition TSAR sélective (zone **1**) apparaissant sur les cartes de transfert.

### 7.1.2.3 Changement de phase sur le canal d'irradiation proton

L'hamiltonien effectif TSAR résultant d'un changement de phase des irradiations uniquement sur le canal proton peut s'écrire ainsi :

$$H_{\text{eff}} = \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{AB,(23)} + \omega_{DQ}^{\text{AUTO}} I_{\tilde{Z}}^{AB,(14)} - \frac{\tau}{2} \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} \left( \text{Im}(\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{X}}^{AB,(23)} H_{\tilde{Z}} - \text{Re}(\omega_{ZQ,\delta p_0}^{\text{TSAR}}) 2I_{\tilde{Y}}^{AB,(23)} H_{\tilde{Z}} \right)$$

**Equation 7-14**

La lecture de l'équation 1-14 révèle que, dans ce cas, les termes auto-croisés sont toujours présents et inchangés. Le terme TSAR est quant à lui diminué. Il semblerait donc que ce changement de phase soit défavorable à un transfert TSAR efficace.

L'application d'un changement de phase au milieu de l'irradiation CW simultanée sur les canaux  $A$  et  $B$  avec ou sans changement de phase sur la voie proton ne modifie pas le mécanisme de transfert TSAR, qui est toujours

un mécanisme du second-ordre faisant intervenir les couplages dipolaires  $A$ - $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ - $B$ . Cependant, ce changement atténue la contribution longitudinale des termes auto-croisés. La théorie prédit donc que l'efficacité du mécanisme TSAR devrait en être améliorée. Au contraire, il semblerait que l'efficacité du mécanisme TSAR soit diminuée quand le changement de phase a lieu uniquement sur la voie proton. Les simulations numériques détaillées dans le paragraphe suivant viennent appuyer les résultats de ces calculs analytiques et nous permettent de cerner les conditions de champs rf à appliquer expérimentalement en vue d'un transfert efficace.

## 7.2 Simulations numériques

Les simulations numériques présentées dans cette partie permettent de tenir compte des termes possédant un ordre supérieur à 2, contrairement aux calculs analytiques décrits plus haut. Nous nous sommes concentrés sur des systèmes de spins modélisant ceux présents dans des échantillons biomoléculaires tels que les protéines. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cas où  $A$  et  $B$  sont identiques et sont des atomes de carbones (cas homonucléaire du mécanisme TSAR : PAR) et au cas où  $A$  est un atome d'azote et  $B$  un atome de carbone (cas hétéronucléaire du mécanisme TSAR : PAIN-CP). Comme lors des calculs analytiques, nous ne nous sommes intéressés qu'au cas ZQ  $\delta p_0$  TSAR, soit  $p_C=p_N$  pour l'expérience PAIN-CP. Comme nous allons le constater, les simulations numériques sont en accord avec les calculs analytiques : l'application d'un changement de phase de 180 degrés au milieu de la période d'irradiation TSAR permet d'améliorer l'efficacité du recouplage mais aussi d'étendre la plage de champs rf où le mécanisme TSAR est actif. Toutes les simulations numériques effectuées dans cette partie ont été réalisées avec le logiciel SpinEvolution<sup>174</sup>.

Toutes les cartes TSAR simulées présentent des caractéristiques communes, représentées en Figure 7-3 dans le cas particulier d'un transfert PAR à courte distance (vitesse de rotation à l'angle magique et champ magnétique principal modérés):

- La condition HORROR, où la valeur du champ appliqué sur la voie carbone est égale à la moitié de la vitesse de rotation, est située le long d'une droite verticale à  $p_C=0,5$ . Cette condition réintroduit les couplages dipolaires carbone-carbone double-quant. Ceci se traduit sur la carte par une zone de transfert négatif. Cependant, par raison de simplicité, tout aimantation inférieure à zéro apparaît en noir sur nos cartes.

- Les conditions de « Rotary Resonance Recoupling » ou  $R^3$ , où la valeur de champ rf appliqué sur la voie carbone est égale à une ou deux fois la valeur de la vitesse de rotation à l'angle magique, sont positionnées à la verticale aux conditions  $p_C=1$  ou  $2$ . Cette deuxième condition induit un déphasage important des cohérences des carbones, le transfert dans ces zones est donc très limité.
- Les conditions de Hartmann-Hahn sont visualisables le long de diagonales aux conditions  $p_C=p_H$ ,  $p_C=p_H\pm 1$ ,  $p_C=p_H\pm 2$ ,  $p_C=\pm 1-p_H$  et  $p_C=\pm 2-p_H$ . Ces conditions impliquent une fuite d'aimantation des hétéronoyaux vers le proton. Ceci se caractérise sur les cartes par des zones où l'aimantation présente sur le spin observé (ou le spin ne possédant pas d'aimantation en début de simulation) est très faible voire nulle.
- Des conditions de recouplage PAR double-quanta apparaissent également le long d'axes verticaux aux conditions  $p_C=0,5$  ;  $1$  ;  $1,5$  et  $2$ . Cette quatrième condition implique un transfert d'aimantation TSAR double-quanta (négatif). Ce transfert entre en compétition avec le transfert d'aimantation TSAR zéro-quanta (positif), ce qui se traduit par des zones où le transfert est très faible.

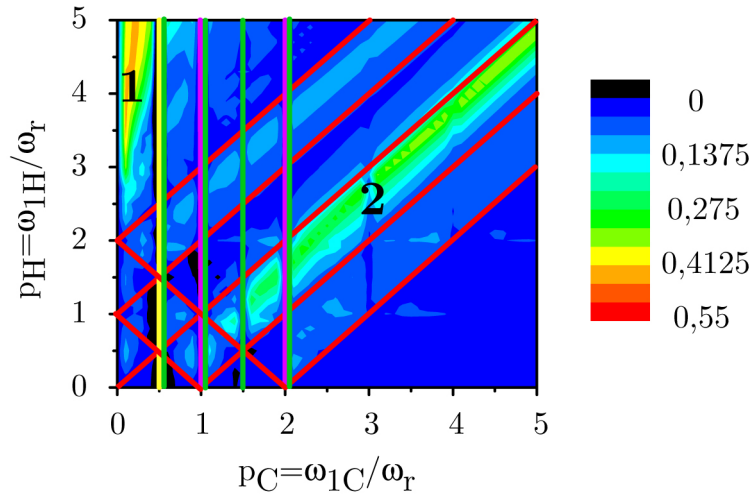


Figure 7-3. Visualisation des conditions HORROR,  $R^3$ , H.H. et PAR sur une carte de transfert de polarisation via un recouplage PAR en fonction des puissances de champs rf carbone et proton  $p_C$  et  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation. Les conditions  $R^3$  sont représentées par des droites verticales violettes, la condition HORROR par une droite verticale jaune, les conditions de recouplage PAR DQ par les droites verticales vertes et les conditions de Hartmann-Hahn par les diagonales rouges. Les deux zones où le recouplage TSAR ZQ est actif sont numérotées 1 et 2. Le transfert est détaillé en Figure 7-4.



Parmi ces conditions défavorables au recouplage zéro-quanta, un transfert d'aimantation zéro-quanta TSAR est cependant visible en deux zones différentes, numérotées **1** et **2** sur la Figure 7-3.

### 7.2.1 Cas homonucléaire

Les simulations présentées de la Figure 7-4 à la Figure 7-7 utilisent le système de spins illustré en Figure 7-4 (a). Il est composé d'un atome de carbone  $C_\alpha$  auquel sont liés de façon covalente un atome d'hydrogène  $H_\alpha$  et un atome de carbone  $C_\beta$ . La distance entre les deux atomes de carbones est typique d'une liaison simple carbone-carbone (1,54 Å). Il en est de même de la longueur de la liaison carbone-proton (1,08 Å). L'angle  $H-C_\alpha-C_\beta$  est de 109,5°. Le système de spins est également constitué d'un atome de carbone  $C_{\text{remote}}$  distant de 4,5 Å et de 3,56 Å du  $C_\alpha$  et du  $H_\alpha$ , respectivement. Les coordonnées spatiales, les déplacements chimiques isotropes, l'anisotropie de déplacement chimique (CSA), les paramètres d'asymétrie et l'orientation du CSA utilisés dans les simulations pour chaque spin sont regroupés dans la Table 7-1. Les couplages scalaires  $J$  homonucléaires et hétéronucléaires ne sont pas inclus dans les simulations. Dans toutes les simulations présentées dans ce paragraphe, l'aimantation est initialement présente sur le carbone  $C_\alpha$ . Selon les simulations, l'aimantation observée est celle transférée soit au  $C_\beta$  (Cf. Figure 7-4 et Figure 7-6) soit au  $C_{\text{remote}}$  (Cf. Figure 7-5 et Figure 7-7).

	X(Å)	Y(Å)	Z(Å)	$\sigma_{\text{iso}}$ (ppm)	$\sigma_{\text{aniso}}$ (ppm)	$\eta$	Orientation du CSA (degrés)
$H_\alpha$	0	0	0	0	7,7	0,65	(90 ; -90 ; 90)
$C_\alpha$	0	0	-1,08	10	-20	0,43	(90 ; 90 ; 0)
$C_\beta$	0	1,44	-1,60	-10	-20	0,5	(92,4 ; 116 ; 158,9)
$C_{\text{remote}}$	1,58	1,23	2,95	-10	-20	0,5	(99,4 ; 146 ; 138,9)

**Table 7-1.** Description du système de spins utilisé dans les simulations reportées de la Figure 7-4 à la Figure 7-7.

Sur la Figure 7-4 sont représentées les simulations de transfert d'aimantation du  $C_\alpha$  au carbone directement lié  $C_\beta$  sur un spectromètre 400 MHz et pour une vitesse de rotation à l'angle magique de 20 kHz. Quatre cartes de transfert sont représentées : une carte correspondant au transfert ZQ PAR classique (b), une carte correspondant au transfert PAR où un change-

ment de phase de  $\pi$  a lieu sur le canal proton (c), sur le canal carbone (d) et sur les deux canaux en même temps (e).

Lors de la simulation de transfert PAR ZQ, la première condition de recouplage se situe à des champs utilisant de basses puissances sur la voie carbone ( $p_C < 0,5$  et  $p_H > 3$ ), ce qui permet un recouplage sélectif. La deuxième condition se situe juste en dessous de la diagonale ( $p_H < p_C$ ) mais uniquement pour des champs assez élevés ( $p_C > 2$ ). Comme cette condition utilise des champs rf assez importants, ceci correspond à un recouplage large-bande. Cette carte de transfert est comparée à celle obtenue lorsqu'un changement de phase a lieu sur le canal carbone uniquement. Dans ce cas, la deuxième condition n'est plus présente mais la première, résultant en un recouplage sélectif, est plus efficace et plus étendue. Ceci confirme les résultats obtenus lors des calculs analytiques. Lorsque seule la phase de l'irradiation sur la voie proton est modifiée, les simulations confirment également les résultats de la théorie. Dans ce cas, le transfert TSAR n'est pas favorisé. La carte (b) est également comparée à celle obtenue lors de la simulation du transfert PAR lorsqu'un changement de phase a lieu au milieu de l'irradiation sur les deux canaux simultanément. Dans ce cas, seule la deuxième condition large bande est encore présente. Cependant, elle est cette fois-ci élargie et permet un transfert d'aimantation beaucoup plus efficace (jusqu'à 15 dixièmes plus élevés selon les valeurs de champs rf). Là aussi, les résultats obtenus par la théorie sont confirmés.

Cependant, l'objectif de ces séquences est de permettre la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines. Dans ce cas, les contacts intéressants à détecter sont ceux à longue distance. Il est donc important de vérifier que la séquence PAR- $\pi$ -shift permet d'améliorer le transfert entre deux spins distants de plus de 4 Å. La Figure 7-5 présente la simulation du transfert d'aimantation du  $C_\alpha$  au carbone  $C_{\text{remote}}$ , qui est situé à 4,5 Å, en présence d'un atome de carbone directement lié au  $C_\alpha$ . Cette situation permet d'étudier l'efficacité des séquences PAR et PAR- $\pi$ -shift vis-à-vis du phénomène de troncature dipolaire. Cette fois encore, deux zones de transfert carbone-carbone TSAR sont visibles sur la carte (c), cas du PAR classique, une seule zone permettant un recouplage sélectif sur la carte (e) où le changement de phase a lieu sur le canal proton, une seule zone permettant du recouplage large-bande sur la carte (f), où le changement de phase a lieu sur les deux canaux, et le transfert n'est pas favorisé sur la carte (d), où le changement de phase a lieu sur le canal proton. Comme lors du transfert d'aimantation au  $C_\beta$ , ces résultats confirment les calculs analytiques. Comme dans le cas précédent, les zones présentes sur les cartes (e) et (f) sont élargies et permettent un transfert plus efficace après introduction des changements de phase. Malgré la présence d'un atome directement lié, les séquences PAR et PAR- $\pi$ -shift sont donc ca-

pables d'induire un transfert d'aimantation entre un carbone et un autre distant de plusieurs Angströms, en présence d'un troisième directement lié au premier. Ces séquences permettent d'atténuer l'effet de la troncature dipolaire. Les améliorations constatées lors de l'introduction du changement de phase sont visualisées plus facilement sur la Figure 7-5 (b), qui représente l'efficacité de transfert en fonction de la puissance du champ sur la voie proton quand la valeur du champ sur la voie carbone est fixée à une valeur permettant un transfert optimal. L'application d'un changement de phase de 180 degrés au milieu du bloc d'irradiation PAR permet une amélioration d'un facteur deux à la fois de l'efficacité mais aussi de la largeur des conditions de champs rf pour lesquelles le mécanisme TSAR est actif.

Dans les conditions expérimentales considérées jusqu'ici (champ magnétique principal et vitesse de rotation à l'angle magique moyens), les spectres de biopolymères souffrent d'une résolution insuffisante. Ceci est particulièrement vrai pour les gros systèmes. Il est donc nécessaire d'avoir à sa disposition des séquences de recouplage efficaces (1) dans le régime « ultrafast MAS » où la vitesse de rotation est supérieure à 40 kHz<sup>24, 25</sup> mais aussi (2) à haut champ magnétique afin d'obtenir des spectres plus résolus. Nous avons donc dans un premier temps simulé le transfert d'aimantation entre le spin  $C_\alpha$  et le spin directement lié  $C_\beta$  à 60 kHz de vitesse de rotation et sur un spectromètre 900 MHz (Cf. Figure 7-6). Plusieurs zones de transfert PAR sont visibles sur la carte (b) où le transfert PAR classique est simulé. Ces zones correspondent notamment à  $p_C \approx 1,1$  et  $1,8$  et  $p_H \approx 0,4$  et  $1,4$ , respectivement. La lecture de la carte (d) nous apprend que la zone utilisant les champs rf les plus élevés perd énormément en efficacité de transfert après introduction du changement de phase sur la voie carbone uniquement. Sur la carte (e), la première zone de transfert, utilisant les champs rf les plus bas, ne semble pas affectée par l'introduction du changement de phase mais la deuxième est nettement élargie. De plus, encore une fois, l'introduction du changement de phase permet de fortement améliorer l'efficacité de transfert dans cette zone. La carte (c) présente également des zones où l'introduction du changement de phase sur la voie proton est bénéfique par rapport aux conditions de recouplage PAR, mais ces zones restent moins efficaces que celles présentées en (e).

Dans le cas d'un transfert d'aimantation du carbone  $C_\alpha$  au carbone  $C_{remote}$ , en présence d'un atome de carbone directement lié au  $C_\alpha$ , la carte (b) présente à nouveau plusieurs zones de transfert PAR efficace, similaires à celles visibles sur la Figure 7-6. Après insertion d'un changement de phase sur la voie carbone, comme lors du transfert au  $C_\beta$ , la zone utilisant les plus hautes fréquences et donc permettant un recouplage large-bande sur la carte (d) ne subit pas beaucoup de modifications.

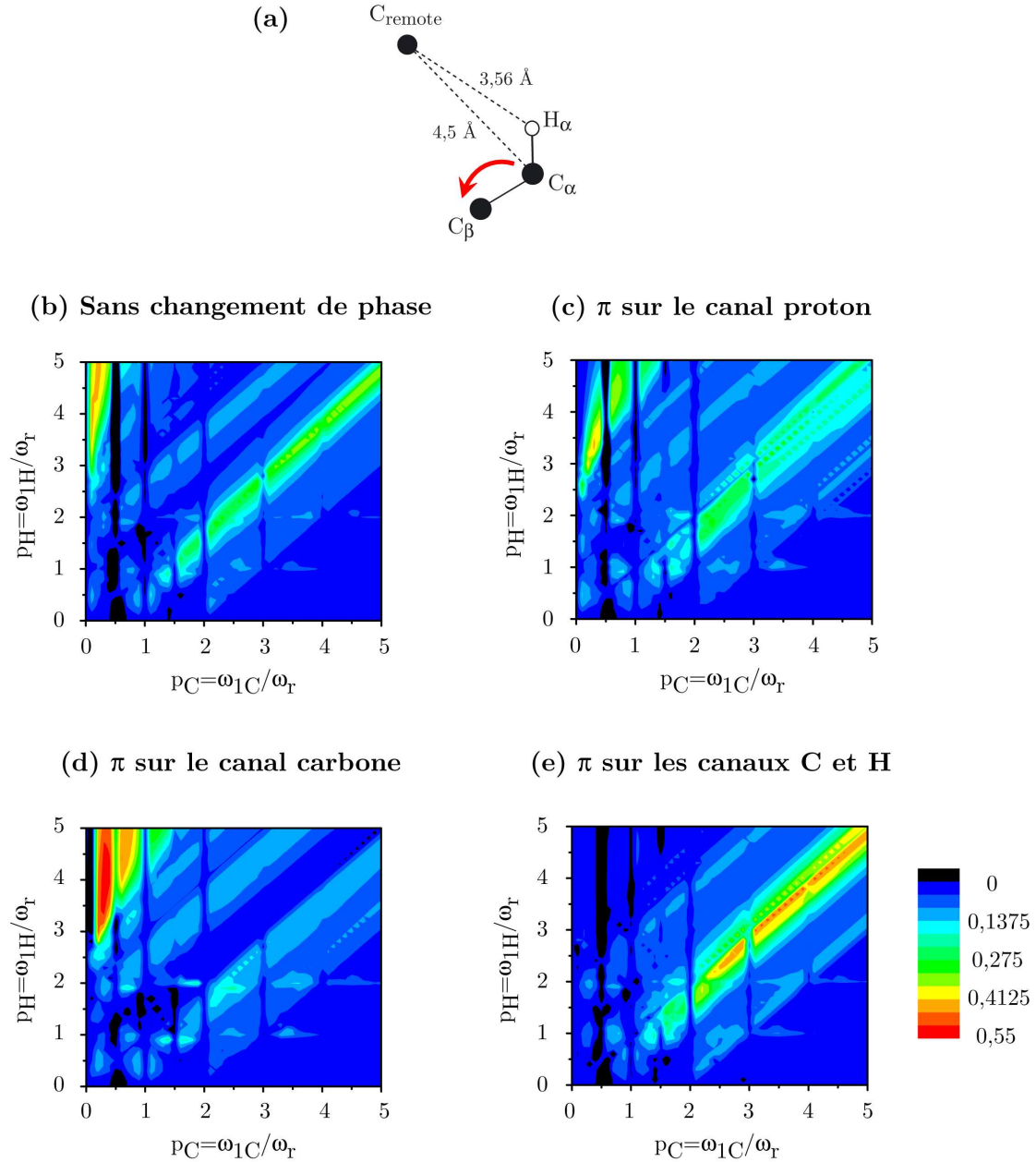


Figure 7-4. Transferts de polarisation en fonction des puissances de champs rf carbone et proton  $p_C$  et  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation lors d'expériences de type ZQ PAR avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 20$  kHz. Le délai d'irradiations est de 1,5 ms. (a) Système de spins utilisé lors des simulations. L'aimantation est transférée du  $C_{\alpha}$  au  $C_{\beta}$  en présence d'un carbone plus éloigné appelé  $C_{\text{remote}}$  et d'un proton  $H_{\alpha}$  lié de façon covalente au  $C_{\alpha}$ . (b) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR classique. (c) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie proton. (d) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie carbone. (e) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR- $\pi$ -shift où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur les voies carbone et proton. L'échelle de transfert est la même pour les quatre simulations et est indiquée en bas à droite de la figure. Elle est normalisée à 1.

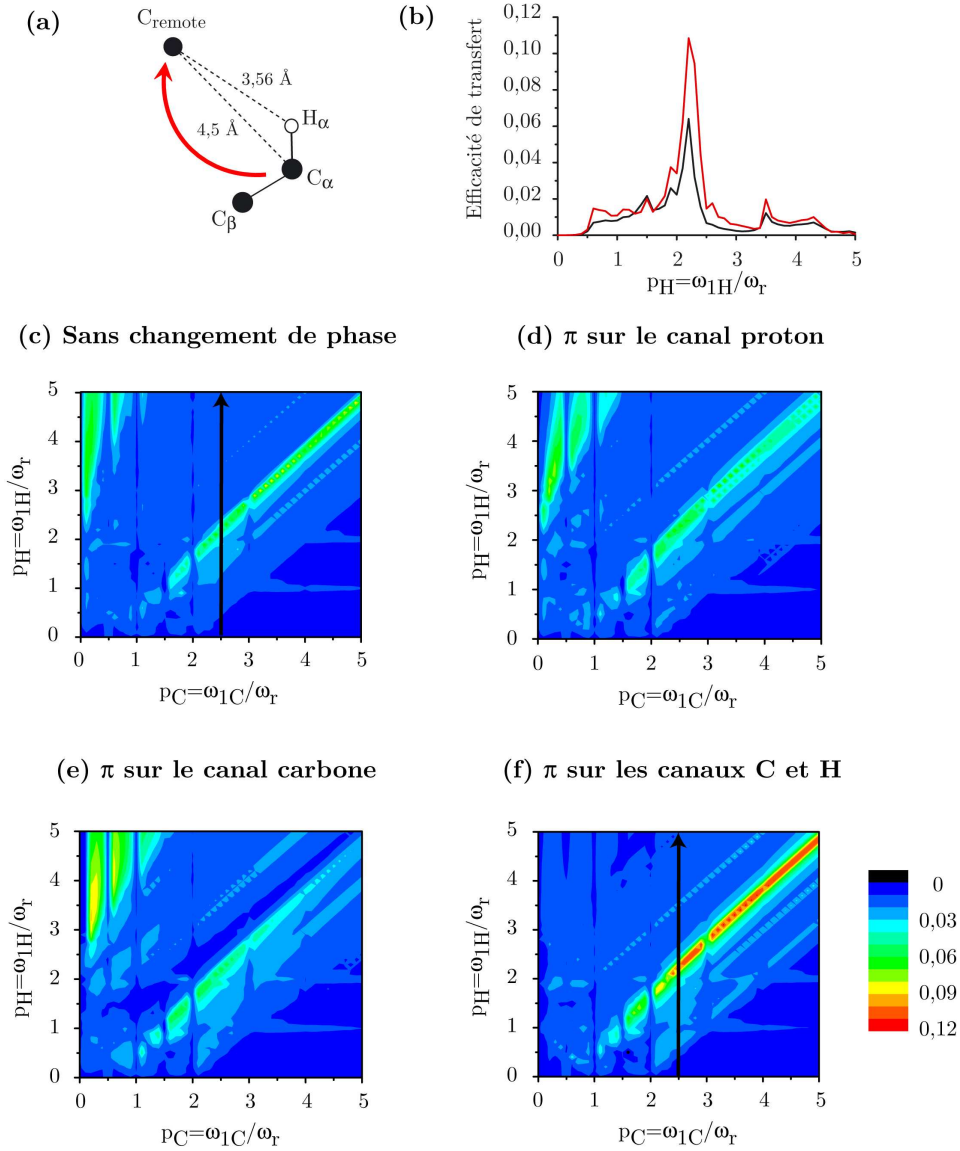


Figure 7-5. Transferts de polarisation en fonction des puissances de champs rf carbone et proton  $p_C$  et  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation lors d'expériences de type ZQ PAR avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 20$  kHz. Le délai d'irradiations est de 5 ms. (a) Système de spins utilisé lors des simulations. L'aimantation est transférée du  $C_\alpha$  à un carbone plus éloigné appelé  $C_{remote}$  en présence d'un  $C_\beta$  et d'un proton  $H_\alpha$  liés de façon covalente au  $C_\alpha$ . (b) Efficacité de transfert pour les expériences PAR (en noir) et PAR- $\pi$ -shift (en rouge) en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur la voie proton exprimée en unité de vitesse de rotation  $p_H$ .  $p_C$  est fixé à 2,5. La position de ces profils est indiquée par les flèches verticales sur la Figure 7-5 (c) et (f). (c) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR classique. (d) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie proton. (e) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie carbone. (f) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR- $\pi$ -shift où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur les voies carbone et proton. L'échelle de transfert est la même pour les cinq simulations et est indiquée en bas à droite de la figure. Elle est normalisée à 1.

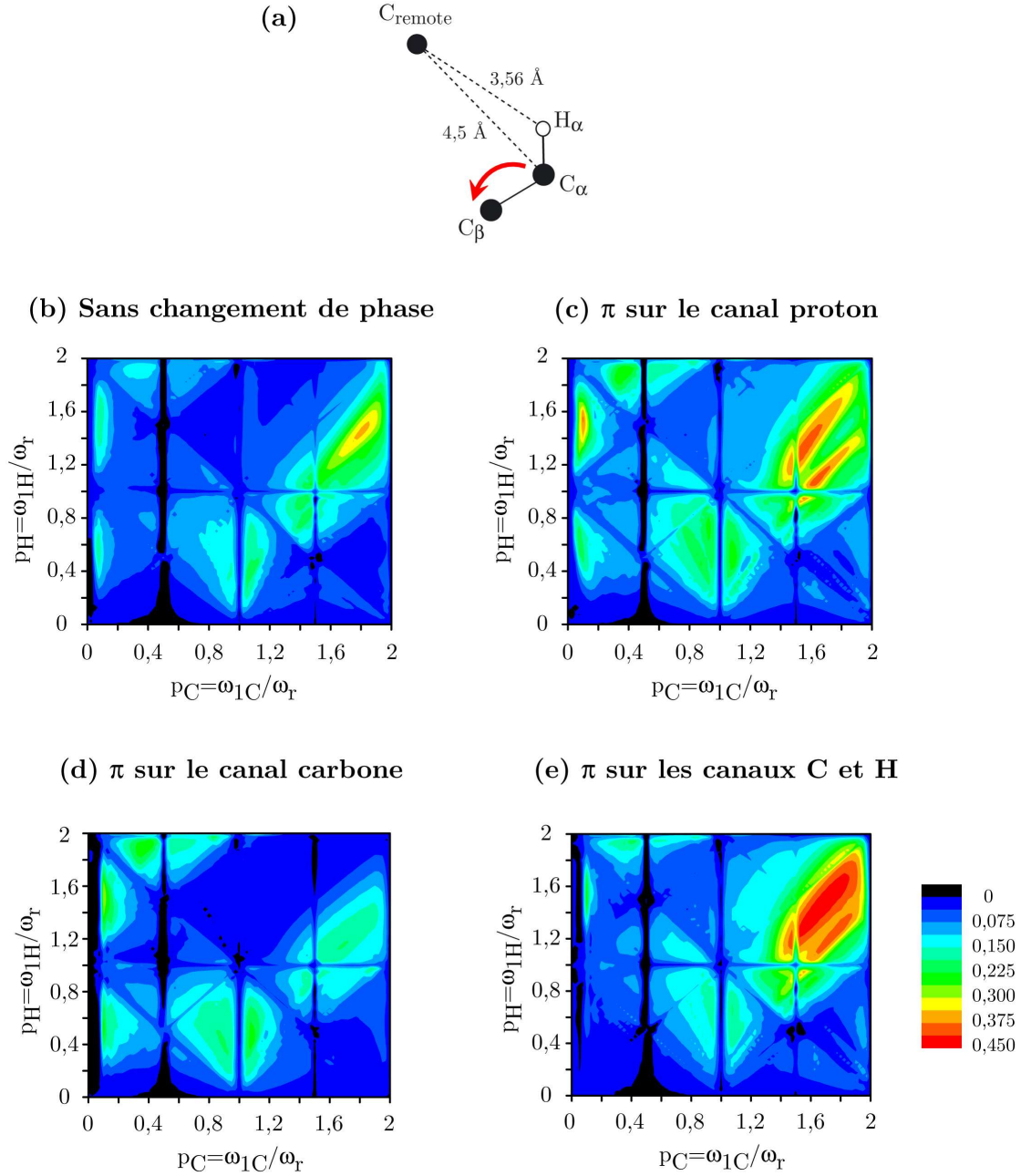


Figure 7-6. Transferts de polarisation en fonction des puissances de champs rf carbone et proton  $p_C$  et  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation lors d'expériences de type ZQ PAR avec  $\omega_H/2\pi = 900$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 60$  kHz. Le délai d'irradiations est de 1,5 ms. (a) Système de spins utilisé lors des simulations, identique à celui présenté en Figure 7-4 (a). (b) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR classique. (c) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie proton. (d) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie carbone. (e) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR- $\pi$ -shift où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur les voies carbone et proton. L'échelle de transfert est la même pour les quatre simulations et est indiquée en bas à droite de la figure. Elle est normalisée à 1.

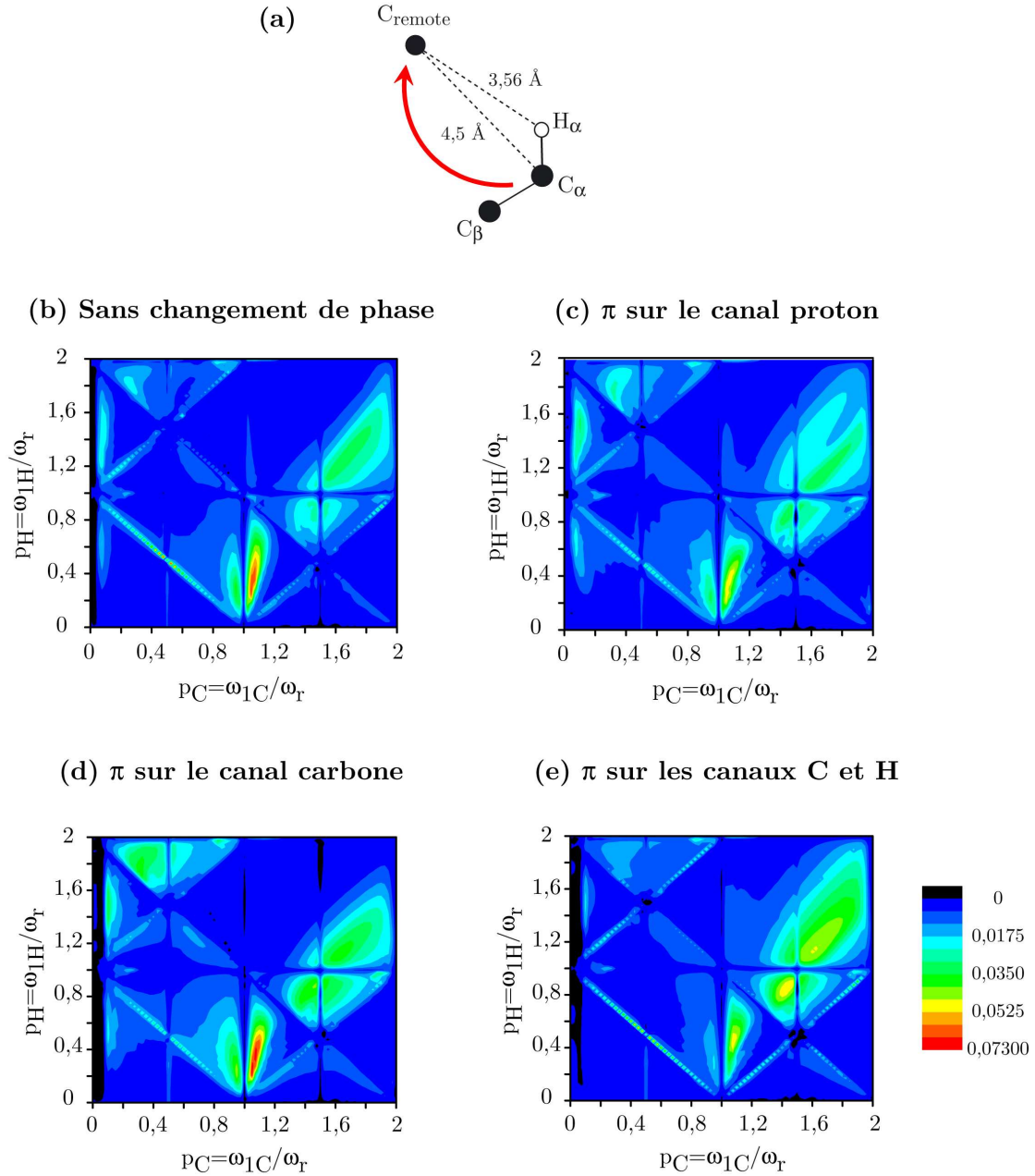


Figure 7-7. Transferts de polarisation en fonction des puissances de champs rf carbone et proton  $p_C$  et  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation lors d'expériences de type ZQ PAR avec  $\omega_H/2\pi = 900$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 60$  kHz. Le délai d'irradiations est de 5 ms. (a) Système de spins utilisé lors des simulations. Système de spins utilisé lors des simulations, identique à celui présenté en Figure 7-5 (a). (b) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR classique. (c) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie proton. (d) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur la voie carbone. (e) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ PAR- $\pi$ -shift où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur les voies carbone et proton. L'échelle de transfert est la même pour les quatre simulations et est indiquée en bas à droite de la figure. Elle est normalisée à 1.



La zone permettant le recouplage sélectif voit quant à elle son efficacité légèrement améliorée. Sur la carte (e), la zone correspondant à  $p_C \approx 1,8$  et  $p_H \approx 1,4$  est nettement élargie et permet un transfert plus efficace. Sur la carte (c), le transfert TSAR est globalement moins bon qu'avant l'introduction du changement de phase.

L'introduction d'un changement de phase au milieu de la période d'irradiation sur le canal carbone seul ou simultanément sur le canal proton permet donc de rendre plus efficace le transfert d'aimantation d'un carbone à un autre, que ce soit un carbone directement lié ou un carbone à plus longue distance. Elle permet également d'élargir les conditions de champs rf pour lesquelles le recouplage TSAR est actif. Il est donc plus facile de mettre en place des expériences PAR- $\pi$ -shift.

### 7.2.2 Cas hétéronucléaire

Nous sommes également intéressés au transfert hétéronucléaire PAIN-CP entre un azote et un carbone typique d'un acide aminé présent dans une protéine. Lors des simulations, nous avons utilisé le système de spins illustré en Figure 7-8 (a). Il est composé d'un atome d'azote N auquel sont liés de façon covalente un atome d'hydrogène  $H_n$  et un atome de carbone  $C_\alpha$ . La distance entre l'atome d'azote et l'atome de carbone est de 1,44 Å et celle entre l'atome d'azote et l'atome d'hydrogène est de 0,97 Å. Les coordonnées spatiales de ces trois atomes ont été extraites de la structure cristalline de MLF, et plus particulièrement du premier acide aminé constituant ce tripeptide, la leucine<sup>334</sup>. Les coordonnées spatiales, les déplacements chimiques isotropes, l'anisotropie de déplacement chimique (CSA), les paramètres d'asymétrie et l'orientation du CSA pour chaque spin sont regroupés dans la Table 7-2. Les couplages scalaires  $J$  homonucléaires et hétéronucléaires ne sont pas inclus dans les simulations. Dans toutes les simulations présentées dans ce paragraphe, l'aimantation est initialement présente sur l'azote et l'aimantation observée celle transférée au carbone.

Sur la Figure 7-8 sont représentées les simulations de transfert d'aimantation de l'azote à son carbone directement lié  $C_\alpha$  sur un spectromètre 400 MHz et pour une vitesse de rotation à l'angle magique de 9 kHz. Deux cartes de transfert sont représentées : une carte (b) correspondant au transfert ZQ  $\delta p_0$  PAIN-CP classique et une (c) correspondant au cas où le changement de phase de  $\pi$  a lieu sur les trois canaux en même temps. Comme dans le cas homonucléaire, nous observons les conditions HORROR,  $R^3$ , Hartmann-Hahn et transfert PAIN-CP DQ. Cependant, un transfert d'aimantation PAIN-CP



ZQ vers le  $C_\alpha$  est également visible. Deux régions sont discernables sur la carte (b). La première condition se situe à des champs utilisant de plus basses puissances sur les voies carbone et azote ( $p_{C/N} < 2,5$  et  $p_H > 3$ ) et permet un recouplage sélectif. Elle est d'ailleurs dans ce cas la condition permettant le recouplage le plus efficace. La deuxième condition se situe juste en dessous de la diagonale ( $p_H < p_C$ ) mais uniquement pour des champs assez élevés ( $p_C > 2$ ). Ceci correspond à un recouplage large-bande. Cette carte est comparée à celle obtenue lors de la simulation du transfert PAIN-CP lorsqu'un changement de phase a lieu au milieu de l'irradiation sur les trois canaux simultanément (carte (c)). Dans ce cas, seule la deuxième condition large bande est encore présente. Elle est cette fois-ci également élargie et permet un transfert d'aimantation beaucoup plus efficace (jusqu'à 20 dixièmes plus élevés selon les valeurs de champs rf).

	X(Å)	Y(Å)	Z(Å)	$\sigma_{iso}$ (ppm)	$\sigma_{aniso}$ (ppm)	$\eta$	Orientation du CSA (degrés)
N	0	0	-0,97	0	99	0,19	(-90 ; -90 ; -17)
$C_\alpha$	0	1,26	-1,67	0	20	0,7	(90 ; 90 ; 0)
$H_n$	0	0	0,07	0	0	0	(0 ; 0 ; 0)

**Table 7-2.** Description du système de spins utilisé dans les simulations reportées en Figure 7-8.

Ces améliorations peuvent être plus facilement visualisées grâce à des profils simulés. Les coupes réalisées à travers les cartes de transfert sont schématisées par des flèches sur les cartes (b) et (c) de la Figure 7-8. Sur la Figure 7-9 (a) est comparée l'efficacité de transfert pour les séquences PAIN-CP (en noir) et PAIN-CP- $\pi$ -shift (en rouge) en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur le canal proton exprimée en unité de vitesse de rotation  $p_H$ . Dans ce cas,  $p_C$  est égal à  $p_N$ . Ces deux puissances sont fixées à 2,5. L'efficacité de transfert lors de l'utilisation de la séquence PAIN-CP- $\pi$ -shift est améliorée de près de 25 %. De plus, la condition est élargie par un facteur deux.

En Figure 7-9 (b) est également représentée l'efficacité de transfert des séquences PAIN-CP (en noir) et PAIN-CP- $\pi$ -shift (en rouge) en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur le canal carbone lorsque  $p_N$  est égal à 2,5 et  $p_H$  est égal à 2,2 dans le cas de la séquence PAIN-CP et à 2,4 dans le cas de la séquence PAIN-CP- $\pi$ -shift. Ces conditions sont choisies de façon à être des conditions optimales de transfert PAIN-CP. Cette simulation permet de visualiser la discordance qu'il peut y avoir entre les champs appliqués sur les voies carbone et azote sans que le transfert PAIN-CP n'en soit trop affecté

(pour rappel, ces champs doivent être égaux pour que le transfert soit optimal). L'application d'un changement de phase plus que double la plage de champ rf sur la voie carbone où le mécanisme TSAR est efficace. La calibration de la séquence PAIN-CP- $\pi$ -shift est donc moins exigeante en termes de précision des champs rf.

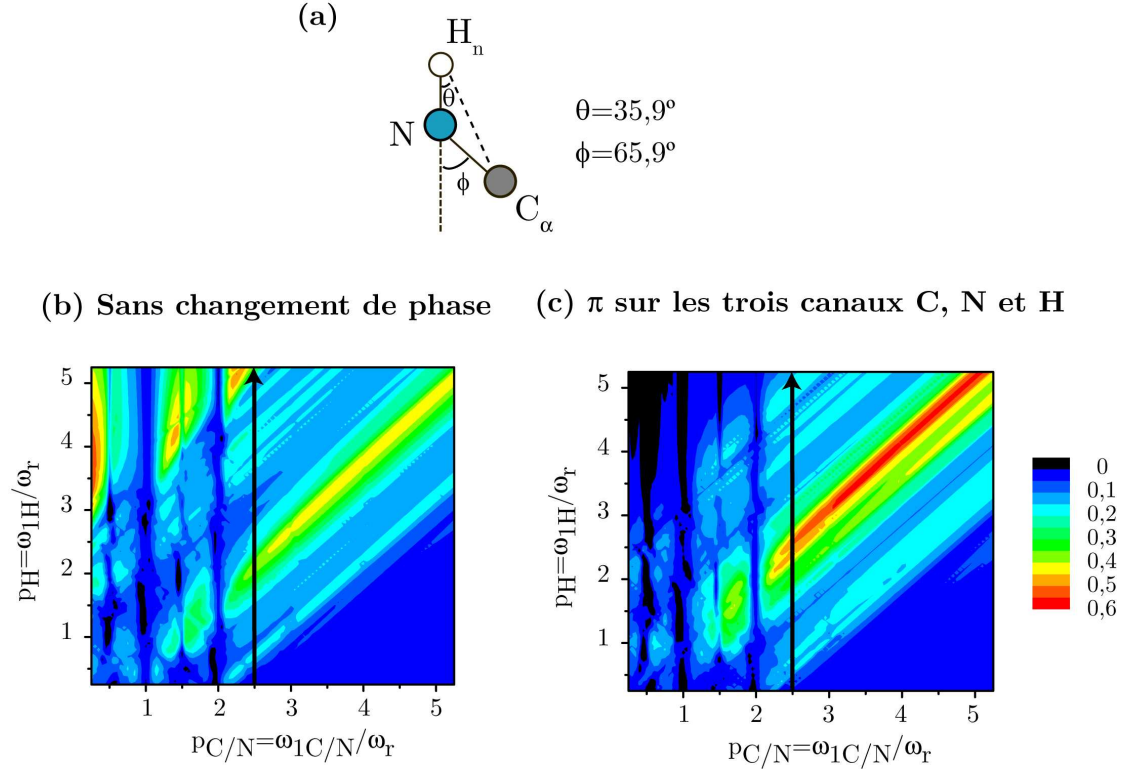
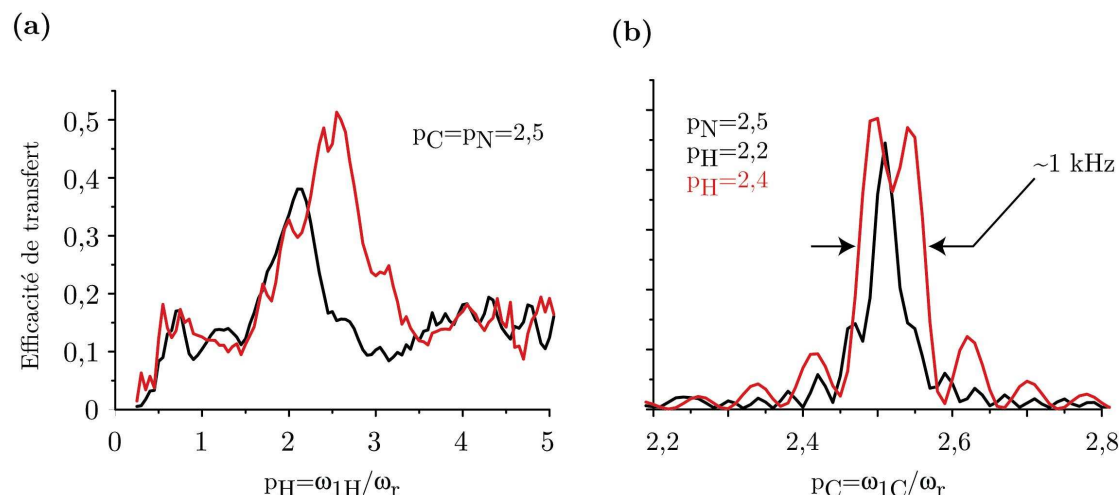


Figure 7-8. Transferts de polarisation en fonction des puissances de champs rf carbone  $p_C$ , azote  $p_N$  et proton  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation lors d'expériences de type ZQ  $\delta p_0$  PAIN-CP avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 9$  kHz. Le délai d'irradiations est de 3 ms. (a) Système de spins utilisé lors des simulations. L'aimantation est transférée de l'azote au  $C_\alpha$  en présence d'un proton  $H_n$  lié de façon covalente à l'azote. (b) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ  $\delta p_0$  PAIN-CP classique. (c) Transfert d'aimantation lors d'une expérience ZQ  $\delta p_0$  PAIN-CP- $\pi$ -shift où un changement de phase  $\pi$  est appliqué sur les voies carbone, azote et proton. L'échelle de transfert est la même pour les deux simulations et est indiquée en bas à droite de la figure. Elle est normalisée à 1.

A nouveau, l'introduction d'un changement de phase au milieu de la période d'irradiation PAIN-CP permet donc de rendre plus efficace le transfert d'aimantation d'un azote à un carbone. Elle permet également d'élargir les conditions de champs rf pour lesquelles le recouplage TSAR est actif, et donc de faciliter les calibrations.

Ces simulations en main, il nous est donc maintenant possible de choisir les valeurs de champs rf pour lesquels le mécanisme TSAR est actif et de

tester ces conditions sur un échantillon biomoléculaire lors de l'enregistrement de spectres de corrélation homonucléaires carbone-carbone (utilisant la séquence PAR- $\pi$ -shift) et de spectres de corrélation hétéronucléaire azote-carbone (utilisant la séquence PAIN-CP- $\pi$ -shift).



**Figure 7-9.** (a) Efficacité de transfert pour les expériences PAIN-CP (en noir) et PAIN-CP- $\pi$ -shift (en rouge) en fonction de la puissance de champ rf appliqué sur la voie proton et exprimée en unité de vitesse de rotation  $p_H$ .  $p_C$  et  $p_N$  sont fixés à 2,5. Ces profils sont schématisés par les flèches verticales sur la Figure 7-8 (b) et (c). (b) Efficacité de transfert pour les expériences PAIN-CP (en noir) et PAIN-CP- $\pi$ -shift (en rouge) en fonction de la puissance de champ rf appliqué sur la voie carbone  $p_C$  et exprimée en unité de vitesse de rotation.  $p_N$  est fixé à 2,5.  $p_H$  est fixé à 2,2 dans le cas de l'expérience PAR et à 2,4 dans le cas de l'expérience PAR- $\pi$ -shift. Le système de spins utilisé est celui représenté en Figure 7-8 (a). L'échelle de transfert est normalisée à 1.

## 7.3 Applications à la RMN biomoléculaire

### 7.3.1 Une calibration simple en trois étapes seulement

Les expériences PAR et PAIN-CP sont perçues comme très difficiles à calibrer. Dans ce paragraphe, nous souhaitons montrer que la calibration de ces séquences, même si elle nécessite de la précision, peut être effectuée en deux ou trois étapes seulement pour les expériences PAR et PAIN-CP, avec ou sans changement de phase, respectivement.

Toutes les calibrations décrites dans la suite de ce paragraphe nécessitent que les amplificateurs soient linéarisés.

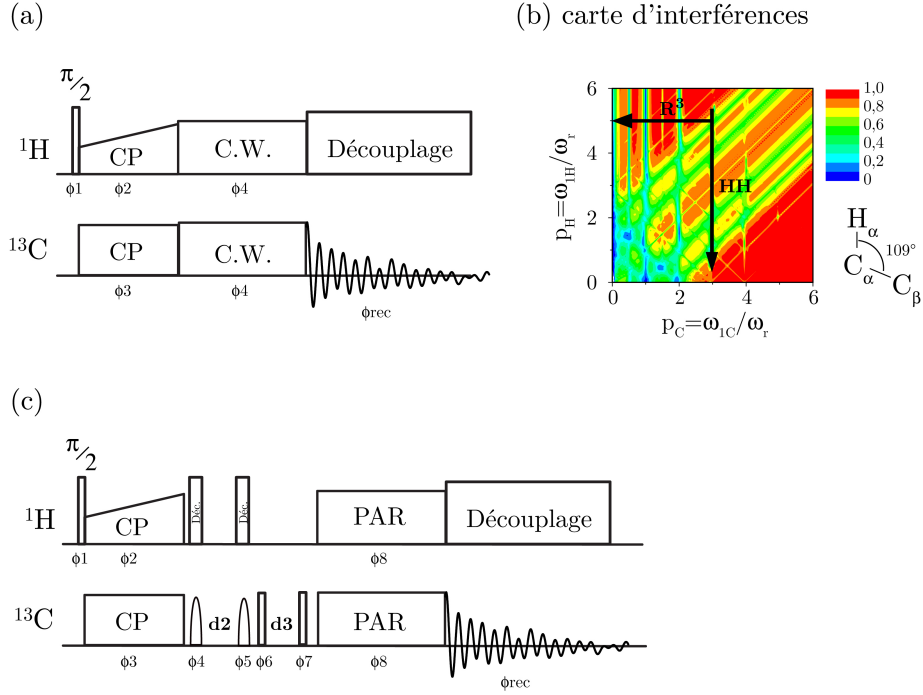
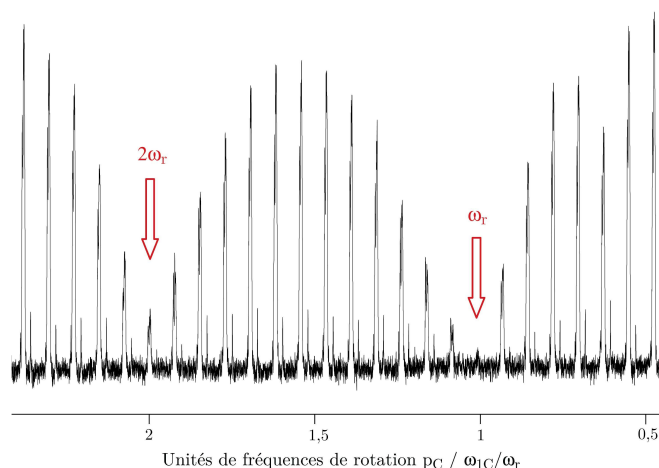


Figure 7-10. (a) Séquence d'impulsion permettant de calibrer la puissance des champs rf utilisés. Les impulsions de 90 degrés sont représentées par les barres verticales blanches. Le cyclage de phase utilisé est le suivant :  $\Phi_1 = x$  ;  $\Phi_2 = y$  ;  $\Phi_3 = x, -x$  ;  $\Phi_4 = x, x, -x, -x$  ;  $\Phi_5 = -x, -x, x, x$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x$ . (b) carte d'interférences permettant de visualiser quelles sont les coupes effectuées expérimentalement afin de détecter les conditions de Hartmann-Hahn (HH) et de « Rotary-Resonance Recoupling » ( $\text{R}^3$ ). Lors de la simulation de la carte d'interférences, l'aimantation est préparée à la fois sur C1 et C2 et la perte d'aimantation est enregistrée en fonction de la puissance de champs rf carbone  $p_{\text{C}}$  et proton  $p_{\text{H}}$  exprimées en unités de vitesse de rotation. (c) Séquence d'impulsion permettant l'enregistrement du profil expérimental PAR. Les impulsions non-sélectives de 90 degrés sont à nouveau représentées par les barres verticales blanches et les impulsions sélectives par des demi-ellipses blanches. Le cyclage de phase utilisé est le suivant :  $\Phi_1 = x$  ;  $\Phi_2 = y$  ;  $\Phi_3 = x, x, x, x, x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x$  ;  $\Phi_4 = -y, -y, -y, -y, -y, -y, -y, -y, y, y, y, y, y, y, y$  ;  $\Phi_5 = y, y, y, y, y, y, y, y, -y, -y, -y, -y, -y, -y, -y$  ;  $\Phi_6 = y, -y$  ;  $\Phi_7 = x, x, -x, -x, y, y, -y, -y$  ;  $\Phi_8 = y, -y, -y, y, -x, x, x, -x$  ;  $\Phi_{\text{rec}} = y, -y, -y, y, -x, x, x, -x, -y, y, y, -y, x, -x, -x, x$ . La séquence permettant l'enregistrement du profil expérimental PAR- $\pi$ -shift ainsi que son cyclage de phase sont identiques sauf que deux phases sont appliquées successivement lors de l'irradiation PAR- $\pi$ -shift :  $\Phi_8 = y, -y, -y, y, -x, x, x, -x$  et  $\Phi_9 = -y, y, y, -y, x, -x, -x, x$ .

La puissance des champs rf sur les voies carbone et azote peut être calibrée grâce à la localisation des conditions de « Rotary-Resonance Recoupling »  $\text{R}^3$ , ayant lieu aux fréquences  $\omega_{\text{X}}/2\pi = \omega_{\text{r}}/2\pi$  et  $2\omega_{\text{r}}/2\pi$  (où  $\text{X} = ^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ). Plus spécifiquement, cette calibration est effectuée grâce à une séquence similaire à la séquence PAR, constituée d'une étape de CP  $^1\text{H}$ -X suivie

d'une irradiation simultanée CW sur les canaux proton et  $X$  (Cf. Figure 7-10 (a)).

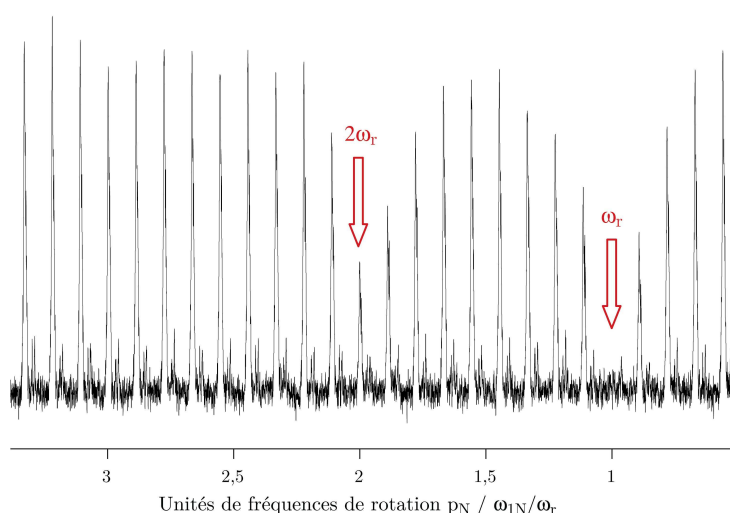
Ces conditions  $R^3$  peuvent être visualisées sur la carte d'interférences présentée en Figure 7-10 (b). Le système de spins utilisé lors de la simulation de cette carte est presque identique à celui utilisé lors des simulations des cartes de transfert homonucléaire mais ne contient plus de  $C_{\text{remote}}$ . Lors de la simulation de la carte d'interférences, l'aimantation est préparée à la fois sur  $C_\alpha$  et  $C_\beta$  et la perte d'aimantation est enregistrée en fonction de la puissance de champs rf carbone  $p_C$  et proton  $p_H$  exprimées en unités de vitesse de rotation. La calibration des champs  $C$  ou  $N$  est représentée sur cette carte par la flèche horizontale «  $R^3$  ». Deux pertes d'aimantation sont visibles aux conditions  $p_C=1$  et 2.



**Figure 7-11.** Calibration de la puissance de champ carbone sur la protéine  $[U-^{13}C, ^{15}N]$ -YajG sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 9$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-10 (a). Evolution de l'intensité des résonances des carboxyles et carbonyles enregistrée en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur la voie carbone lors de l'irradiation CW. La puissance de champ rf sur la voie proton était fixée à 90 kHz et le délai d'irradiation CW à 2 ms. La porteuse était centrée sur les résonances des CO ( $O_1=17500$  Hz). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 1500  $\mu$ s, une force de champ rf moyen sur la voie proton de 80 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. La fenêtre spectrale était de 20 kHz. Le temps d'acquisition était de 20 ms et le temps entre chaque scan de 3 s.

Expérimentalement, nous fixons le délai de double irradiation CW à 1 ou 2 ms. La puissance d'irradiation sur le canal proton est choisie suffisamment haute de façon à éviter les conditions de Hartmann-Hahn entre les pro-

tons et les spins  $X$ . Elle est par exemple de 90 à 100 kHz lorsque la vitesse de rotation est inférieure à 15 kHz. La porteuse est placée au centre des résonances des carbonyles et carboxyles lors de la calibration du champ carbone et au centre des résonances des amides lors de la calibration du champ azote. La puissance du champ sur le canal  $X$  est ensuite variée. Lorsque cette puissance est égale à une ou deux fois la vitesse de rotation, l'intensité des pics observés décroît brutalement, décroissance causée par un recouplage de l'anisotropie de déplacement chimique. Ceci nous permet de calibrer très précisément les puissances de champ rf sur les voies  $X$  égales à  $\omega_r$  et  $2\omega_r$ . La puissance des champs  $X$  à appliquer lors des expériences PAR et PAIN-CP est ensuite choisie grâce aux cartes de transfert simulées.



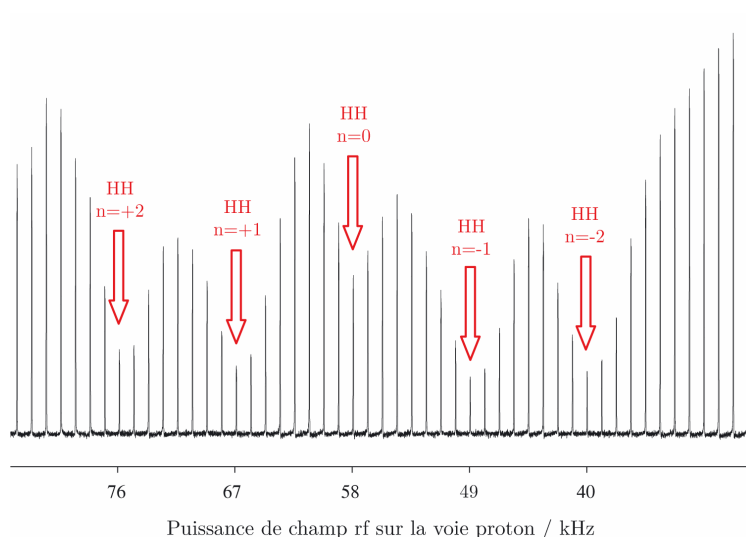
**Figure 7-12.** Calibration de la puissance du champ azote sur la protéine  $[U-^{13}C, ^{15}N]$ -YajG sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 9$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-10 (a). Evolution de l'intensité des résonances des azotes du squelette (amides) enregistrée en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur la voie azote lors de l'irradiation CW. La puissance de champ rf sur la voie proton était fixée à 90 kHz et le délai d'irradiation CW à 2 ms. La porteuse était centrée sur les résonances des amides ( $O_1=4900$  Hz). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 1500  $\mu s$ , une force de champ rf moyen sur la voie proton de 59 kHz et sur la voie azote de 50 kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. La fenêtre spectrale était de 10 kHz. Le temps d'acquisition était de 30 ms et le temps entre chaque scan de 3 s.

La calibration de la puissance du champ carbone sur un échantillon de protéine YajG marquée isotopiquement en carbone 13 et azote 15 est présentée en Figure 7-11. Les deux pertes d'intensité correspondant aux conditions

$\omega_r$  et  $2\omega_r$  sont clairement visibles. Il en est de même lors de la calibration expérimentale de la puissance du champ azote sur le même échantillon, calibration représentée en Figure 7-12.

Dans le cas des expériences PAR, la puissance du champ sur le canal proton peut être optimisée grâce à la même séquence d'impulsion utilisée lors de la calibration des champs  $X$  (Cf. Figure 7-10 (a)). Il serait possible d'observer les noyaux carbones ou azotes mais la détection des premiers est préférée pour des raisons de sensibilité. Le champ proton peut être calibré grâce à la localisation des conditions de Hartmann-Hahn HH, ayant lieu aux fréquences  $\omega_{IX} = \omega_{IH}$ ,  $\omega_{IX} = \omega_{IH} \pm \omega_r$  et  $\omega_{IX} = \omega_{IH} \pm 2\omega_r$ . Ces conditions HH peuvent être visualisées sur la carte d'interférences présentée en Figure 7-10 (b). La calibration du champ proton est représentée sur la carte d'interférences par la flèche verticale « HH ». Cinq pertes d'aimantation sont visibles aux conditions  $p_c=p_H$ ,  $p_c=p_H\pm 1$ ,  $p_c=p_H\pm 2$ . Expérimentalement, la puissance du champ sur la voie carbone est fixée à une valeur correspondant à une condition PAR et la durée d'irradiation à 1 ou 2 ms. L'intensité des résonances des carbonyles et carboxyles est ensuite enregistrée en fonction de la puissance du champ sur la voie proton. L'intensité de ces résonances décroît pour des valeurs de champ rf sur la voie proton correspondant aux conditions de Hartmann-Hahn :  $\omega_{IX} = \omega_{IH}$ ,  $\omega_{IX} = \omega_{IH} \pm \omega_r$  et  $\omega_{IX} = \omega_{IH} \pm 2\omega_r$ . La calibration du champ proton sur un échantillon d'alanine isotopiquement enrichi est illustrée en Figure 7-13. Les pertes en intensité correspondant aux conditions de Hartmann-Hahn sont clairement visibles et sont représentées par des flèches. La puissance du champ sur la voie proton calibrée de cette façon est ensuite fixée à une valeur correspondant à un transfert PAR efficace d'après les simulations.

Lorsque les expériences PAR sont effectuées dans le régime « ultrafast MAS », il peut être dangereux pour la sonde comme pour l'échantillon d'appliquer des puissances aussi importantes que  $\omega_{IX} \pm 2\omega_r$ , par définition supérieures à 120 kHz pour une vitesse de rotation à l'angle magique de 60 kHz. Dans ce cas, il est plus judicieux de détecter les conditions de Hartmann-Hahn suivantes :  $\omega_{IH} = \omega_{IX}$ ,  $2\omega_r - \omega_{IX}$  (condition DQ) et  $\omega_{IX} + \omega_r$  (condition ZQ). La puissance du champ carbone est fixée à 75 kHz et les conditions Hartmann-Hahn sont détectées à 75 kHz, 45 kHz et 15 kHz sur la voie proton.



**Figure 7-13.** Calibration de la puissance du champ proton sur l'acide aminé [U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Alanine sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_{\text{H}}/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_{\text{r}}/2\pi = 9$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-10 (a). Evolution de l'intensité de la résonance du carboxyle enregistrée en fonction de la puissance de champ rf appliquée sur la voie carbone lors de l'irradiation CW. La puissance de champ rf sur la voie carbone était fixée à 40 kHz et le délai d'irradiation CW à 2 ms. La porteuse était centrée sur la résonance du CO ( $\text{O}_1=17800$  Hz). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 750  $\mu\text{s}$ , une force de champ rf moyen sur la voie proton de 67 kHz et sur la voie carbone de 58 kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. La fenêtre spectrale était de 25 kHz. Le temps d'acquisition était de 30 ms et le temps entre chaque scan de 3 s.

Dans le cas des expériences PAIN-CP, il pourrait être envisagé de calibrer le champ sur la voie proton en utilisant une séquence PAIN-CP 1D, en fixant les champs sur les voies carbone et azote aux valeurs permettant un transfert efficace selon les cartes simulées et enfin, en variant la puissance du champ proton. La condition de transfert PAIN-CP optimale serait celle qui donne les résonances les plus intenses. Cependant, dans le cas d'échantillons de protéines, il peut être très difficile d'optimiser le champ proton de cette façon, principalement à cause de la faible sensibilité de ces échantillons mais aussi compte tenu du fait qu'il y a peu de signal apporté par les contacts courtes distances entre les azotes et les carbones. Dans ce cas, il est préférable d'optimiser le champ proton de la même façon que lors des expériences PAR.

La calibration précise de nos champs rf nous a ensuite permis d'appliquer avec succès les séquences PAR- $\pi$ -shift (homonucléaire) et PAIN-CP- $\pi$ -shift (hétéronucléaire) à la protéine YajG.



### 7.3.2 Cas homonucléaire

#### 7.3.2.1 Profils expérimentaux

Les expériences décrites dans ce paragraphe ont été réalisées sur un échantillon d'alanine isotopiquement enrichi à 10%. De la L-alanine non marquée a été achetée chez Merck et de l'alanine uniformément enrichie en azote 15 et carbone 13 chez CortecNet. L'acide aminé isotopiquement enrichi a été dilué à 10 % dans de l'alanine non marquée, recristallisé dans de l'eau Milli-Q et transféré dans un rotor de 2,5 mm de diamètre (9 mg).

Des profils expérimentaux sur cet échantillon permettant de comparer l'efficacité des expériences PAR et PAR- $\pi$ -shift ont pu être enregistrés grâce à la séquence représentée en Figure 7-10 (c). Cette séquence permet d'isoler l'aimantation d'un spin de carbone gagnée lors du recouplage PAR avec un autre spin, tout en éliminant l'aimantation apportée par l'étape de CP. Pour ce faire, la séquence commence par une étape de polarisation croisée entre les protons et les carbones. Elle est suivie par une impulsion sélective permettant de basculer selon l'axe  $Z$  l'aimantation de la résonance du carboxyle et par une autre impulsion sélective permettant de rebasculer dans le plan ( $XY$ ) l'aimantation du CO uniquement. Entre ces deux impulsions, un délai de quelques millisecondes est inséré de façon à déphaser l'aimantation de tous les autres spins. Ceci conduit à une excitation sélective de la résonance du carboxyle tout en conservant le gain en sensibilité apportée par la CP, mais uniquement pour ce spin. Cette étape est suivie par une irradiation CW PAR, qui permet de transférer l'aimantation du CO aux autres spins, et par l'acquisition. Entre la sélection de la résonance du CO et le bloc de recouplage PAR est inséré un filtre  $Z$ . Nous avons dans ce cas choisi d'observer la résonance du  $C_\alpha$ . Les profils expérimentaux PAR et PAR- $\pi$ -shift sont représentés en Figure 7-14. L'intensité observée correspond uniquement à un transfert de polarisation via un recouplage PAR (en noir) ou PAR- $\pi$ -shift (en rouge). Ces profils valident expérimentalement les calculs analytiques et les simulations numériques : l'ajout d'un changement de phase au milieu de la période d'irradiation PAR permet d'augmenter l'efficacité du transfert à un proche voisin de 20 à 25 % pour des expériences réalisées à de hautes vitesses de rotation ( $\omega_r/2\pi=20$  kHz).

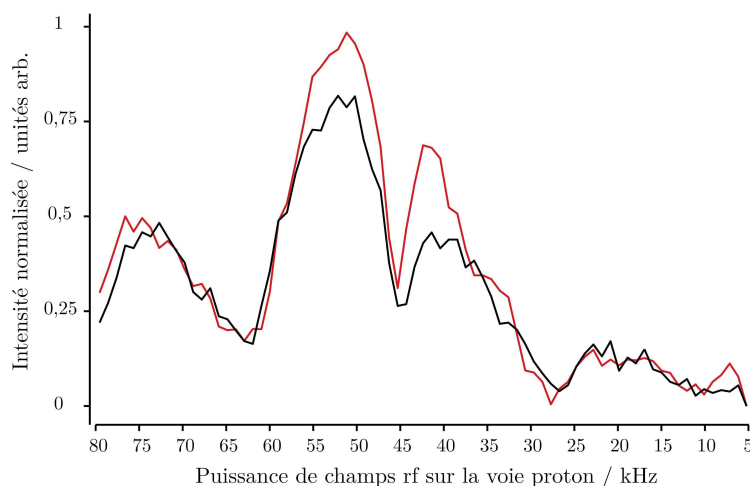


Figure 7-14. Profils expérimentaux PAR enregistrés sur l'acide aminé  $[U-^{13}C, ^{15}N]$ -Alanine sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 20$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-10 (c). Evolution de l'intensité du pic du  $C_\alpha$  de l'alanine en fonction de la puissance du champ rf sur la voie proton appliqué lors d'une expérience PAR (en noir) et PAR- $\pi$ -shift (en rouge) après excitation sélective de la résonance du carboxyle. Le délai d'irradiation PAR ou PAR- $\pi$ -shift était de 1,5 ms et la puissance de champ rf sur la voie carbone de 50 kHz, soit  $p_C=2,5$ . Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée, caractérisée par un temps de contact de 1750  $\mu$ s, une force de champ rf moyen sur la voie proton de 80 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Une rampe de puissance a été appliquée sur le canal proton <sup>256</sup>. Cette étape était suivie par une impulsion sélective Q5 de 1260  $\mu$ s et par une excitation sélective de type Eburp-2 de 2240  $\mu$ s. La longueur de ces impulsions a été choisie de façon à n'exciter que la résonance du CO de l'alanine. Un délai d2 de 5 ms était appliqué entre ces deux impulsions sélectives. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 120 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 140 kHz. La fenêtre spectrale était de 30 kHz. La porteuse était au milieu du spectre ( $O_1=9800$  Hz). Le temps d'acquisition était de 30 ms. Pour chaque point des profils, 400 scans ont été enregistrés, précédés de 16 « dummy scans ». Le temps d'acquisition était de 3 s.

### 7.3.2.2 Expériences de corrélation carbone-carbone

La séquence d'impulsion PAR- $\pi$ -shift représentée en Figure 7-1 (a) nous a permis d'enregistrer un spectre de corrélation carbone-carbone sur un échantillon de protéine uniformément marquée de 20 kDa. La protéine YajG nous a été gracieusement fournie par le Dr. Jean-Pierre Simorre de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble. La protéine a été lentement précipitée dans de l'eau puis directement centrifugée dans des rotors de 4 mm, de 2,5 mm et de 1,3 mm. Le premier spectre que nous avons enregistré l'a été sur un

spectromètre 400 MHz, avec un échantillon tournant à une vitesse de rotation à l'angle magique de 20 kHz (Cf. Figure 7-15). Les conditions PAR- $\pi$ -shift choisies sont les suivantes :  $p_C=2,5$  et  $p_H=2,2$ . Selon les simulations représentées en Figure 7-4 (e) et Figure 7-5 (e), ces conditions permettent un transfert PAR- $\pi$ -shift efficace. Pour des champs plus élevés sur les deux voies, le transfert d'aimantation est meilleur mais nous avons choisi de limiter la puissance que nous appliquons lors de l'expérience afin de préserver la sonde et l'échantillon. Le délai d'irradiation a été choisi assez long (10 ms) de façon à favoriser les transferts à longue distance. Ce spectre bidimensionnel présente de nombreux pics de corrélation, mais ces pics affichent une résolution assez pauvre. Il paraît indispensable pour des échantillons biomoléculaires de cette taille d'augmenter la résolution, ce qui peut être fait en augmentant la valeur du champ principal  $B_0$  du spectromètre mais aussi la vitesse de rotation à l'angle magique. Les séquences de recouplage applicable dans le régime « ultrafast MAS » ne sont pas nombreuses. Il nous est donc apparu nécessaire de vérifier expérimentalement que notre séquence est utilisable dans ce régime.

La séquence PAR- $\pi$ -shift a donc également été testée sur un spectromètre 900 MHz et à une vitesse de rotation à l'angle magique de 60 kHz sur la même protéine YajG (Cf. Figure 7-16). Les conditions PAR- $\pi$ -shift choisies sont les suivantes :  $p_C=1,425$  et  $p_H=1,1$ . Encore une fois, les conditions choisies permettent un transfert de polarisation efficace selon les simulations représentées en Figure 7-6 (e) et Figure 7-7 (e), sans que ce ne soit les conditions optimales. Ces conditions ont à nouveau été choisies par souci de préservation de la sonde et de l'échantillon. Le délai d'irradiation choisi était de 7 ms de façon à favoriser les transferts à longue distance. Le gain en résolution apporté par l'augmentation du champ  $B_0$  et de la vitesse de rotation est sans équivoque. Il est à noter que dans ces conditions expérimentales ( $B_0$ ), la séquence PAR- $\pi$ -shift n'a plus un caractère large bande.

Lors de ces expériences PAR, nous avons dû introduire un filtre  $Z$  avant le bloc de recouplage. En effet, sans ce filtre, les signaux appartenant à la diagonale sont en dispersion et les spectres contiennent des pics de corrélation par le couplage scalaire. Cet effet est notamment visible pour des temps de contact PAR courts. Nous supposons qu'il est dû à un effet COSY. En effet, la courte irradiation PAR sur le canal carbone peut jouer le rôle de la deuxième impulsion de 90 degrés présente dans la séquence COSY. L'ajout du filtre permet d'obtenir des pics diagonaux et des pics de corrélation en absorption. Son effet peut être comparé à celui de l'impulsion supplémentaire présent dans la séquence DQF-COSY.

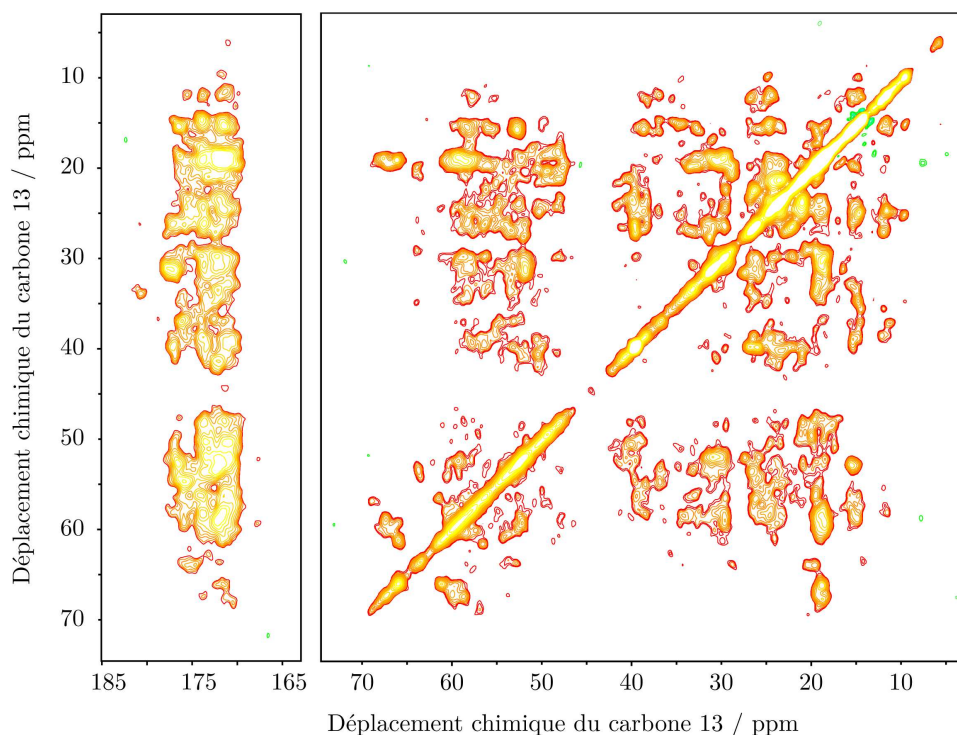


Figure 7-15. Expérience de corrélation carbone-carbone PAR- $\pi$ -shift enregistrée sur la protéine  $[U-^{13}C, ^{15}N]$ -YajG sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 20$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-1 (a). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 1500  $\mu$ s, une force de champ rf moyen sur la voie proton de 80 kHz et sur la voie carbone de 60 kHz. Pendant l'évolution et l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 100 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 140 kHz. Le délai d'irradiation PAR- $\pi$ -shift était de 10 ms et les puissances de champs rf sur la voie carbone de 50 kHz, soit  $p_C=2,5$  et de 44 kHz sur la voie proton, soit  $p_H=2,2$ . La fenêtre spectrale était de 20 kHz dans les deux dimensions. La porteuse était au milieu du spectre dans les deux dimensions ( $O_1=9800$  Hz). Les temps d'acquisition étaient de 20 ms dans la dimension directe et de 10 ms dans la dimension indirecte. Une détection quadrature de type States-TPPI a été utilisée <sup>128</sup>. Le nombre de scans était de 336. Le temps entre deux scans était de 3,5 s, conduisant à un temps expérimental total de 5,5 jours.

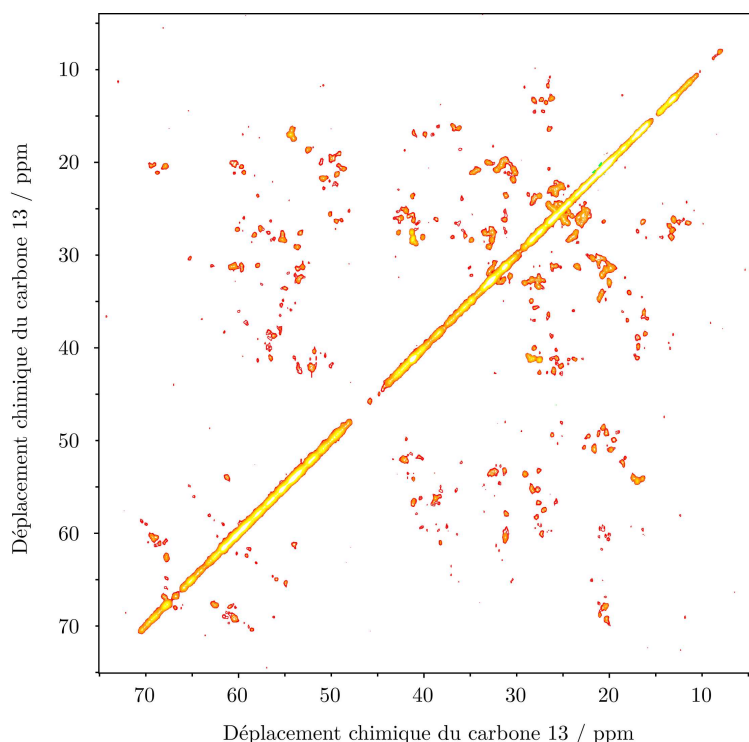


Figure 7-16. Expérience de corrélation carbone-carbone PAR- $\pi$ -shift enregistrée sur la protéine [U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-YajG sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_{\text{H}}/2\pi = 900$  MHz et  $\omega_{\text{r}}/2\pi = 60$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-1 (a). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 800  $\mu\text{s}$ , une force de champ rf moyen sur la voie proton de 15 kHz et sur la voie carbone de 75 kHz. Pendant l'évolution et l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type « low-power TPPM » <sup>240</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 15 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées à un champ de 100 kHz. Le délai d'irradiation PAR- $\pi$ -shift était de 7 ms et les puissances de champs rf sur la voie carbone de 85,5 kHz, soit  $p_{\text{C}}=1,425$  et de 66 kHz sur la voie proton, soit  $p_{\text{H}}=1,1$ . La fenêtre spectrale était de 75 kHz dans la dimension directe et de 20 kHz dans la dimension indirecte. La porteuse était centrée sur les aliphatiques dans les deux dimensions ( $\text{O}_1=8500$  Hz). Les temps d'acquisition étaient de 20 ms dans la dimension directe et de 10 ms dans la dimension indirecte. Une détection quadrature de type States-TPPI a été utilisée <sup>128</sup>. Le nombre de scans était de 192. Le temps entre deux scans était de 2,1 s, conduisant à un temps expérimental total de 2 jours.

### 7.3.3 Cas hétéronucléaire

La séquence de recouplage PAIN-CP- $\pi$ -shift permettant de transférer de l'aimantation des azotes vers les carbones de la protéine YajG a également été validée expérimentalement sur un spectromètre 400 MHz et à une vitesse de rotation à l'angle magique de 9 kHz. Le spectre obtenu est illustré en

Figure 7-17. La séquence PAIN-CP- $\pi$ -shift permet d'obtenir de nombreux pics de corrélation entre les azotes appartenant aux amides de la protéine et ses carbones aliphatiques.

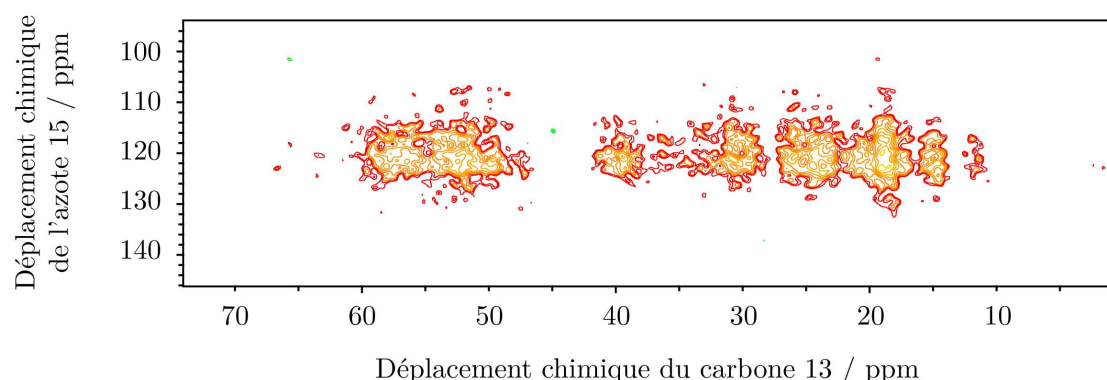


Figure 7-17. Expérience de corrélation azote-carbone PAIN-CP- $\pi$ -shift enregistrée sur la protéine [U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-YajG sur un spectromètre Bruker avec  $\omega_{\text{H}}/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_{\text{r}}/2\pi = 9$  kHz. La séquence utilisée est illustrée en Figure 7-1 (b). Le transfert de polarisation du proton au carbone a été réalisé grâce à une étape de polarisation croisée adiabatique <sup>126</sup>, caractérisée par un temps de contact de 1500  $\mu\text{s}$ , une force de champ rf moyen sur la voie proton de 59 kHz et sur la voie azote de 50 kHz. Pendant l'évolution et l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type SPINAL <sup>127</sup> a été utilisé, à une force de champ rf de 90 kHz. Les impulsions rf sur la voie proton ont été effectuées au même champ. Le délai d'irradiation PAIN-CP- $\pi$ -shift était de 8 ms et les puissances de champs rf sur les voies carbone et azote de 40 kHz, soit  $p_{\text{C}}=p_{\text{N}}=4,4$  et de 37,35 kHz sur la voie proton, soit  $p_{\text{H}}=4,15$ . La fenêtre spectrale était de 30 kHz dans la dimension directe et de 2,6 kHz dans la dimension indirecte. Les temps d'acquisition étaient de 15 ms dans la dimension directe et de 13 ms dans la dimension indirecte. La porteuse était centrée sur les aliphatiques dans la dimension directe ( $O_1=4400$  Hz) et sur les azotes du squelette dans la dimension indirecte ( $O_1=4900$  Hz). Une détection quadrature de type States-TPPI a été utilisée <sup>128</sup>. Le nombre de scans était de 696. Le temps entre deux scans était de 3 s, conduisant à un temps expérimental total de 1,5 jour.

## 7.4 Conclusion

L'introduction d'un changement de phase de 180 degrés au milieu de l'irradiation PAR ou PAIN-CP a mené au développement de deux nouvelles séquences : PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift. Ces séquences sont toujours basées sur le mécanisme TSAR mais les contributions longitudinales, qui amoindrissent l'efficacité du recouplage, sont grandement réduites. Ceci a pour effet d'augmenter l'efficacité du transfert de polarisation mais aussi d'élargir les

conditions de champs rf pour lesquelles le mécanisme TSAR est actif. La calibration de ces séquences est donc plus aisée.

La prochaine étape de ce projet implique l'attribution des résonances carbone et azote de la protéine YajG. Ceci pourrait permettre de comparer davantage les expériences PAR et PAR- $\pi$ -shift. Plus particulièrement, ceci permettrait de comparer le nombre de contacts à longue distance, essentiels à la caractérisation structurale tridimensionnelle, détectables via les séquences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift ou PAR et PAIN-CP classiques. Ceci permettrait également de savoir si certains transferts, selon le type de spins impliqués, sont plus favorisés que d'autres en utilisant les séquences PAR et PAIN-CP- $\pi$ -shift. Enfin, l'utilisation des séquences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift pour la détermination structurale tridimensionnelle de biopolymères pourrait être démontrée sur la protéine YajG.

Une autre poursuite envisageable du projet est l'exploration expérimentale de séquences PAR- $\pi$ -shift et PAIN-CP- $\pi$ -shift utilisant des conditions de recouplage double-quanta ou, dans le cas de l'expérience PAIN-CP- $\pi$ -shift uniquement, des conditions où les champs rf sur les voies carbone et azote sont décalées de une à plusieurs fois la valeur de la vitesse de rotation ( $\delta p_1$ ,  $\delta p_2$  où  $|p_N - p_C| = 1$  ou  $2$  et  $\sigma p_1$ ,  $\sigma p_2$  où  $(p_C + p_N) = 1, 2$ , par exemple). Ces différentes conditions ont déjà été simulées dans le cas d'une expérience PAIN-CP classique mais jamais pour une expérience PAIN-CP- $\pi$ -shift. De plus, aucune de ces conditions n'a été vérifiée expérimentalement.

Enfin, puisqu'il semble que l'introduction d'un changement de phase au milieu de la période d'irradiation TSAR permet d'améliorer les caractéristiques du recouplage, qu'en est-il lorsque plusieurs changements sont effectués successivement lors du bloc TSAR ? Cette méthode, que nous appelons « TSAR supercyclé » est un projet en cours au laboratoire.

**Partie IV**  
**RMN en phase solide et archéologie**





## Chapitre 8

---

Etude de bois archéologiques par RMN en phase solide



## 8. Etude de bois archéologiques par RMN en phase solide

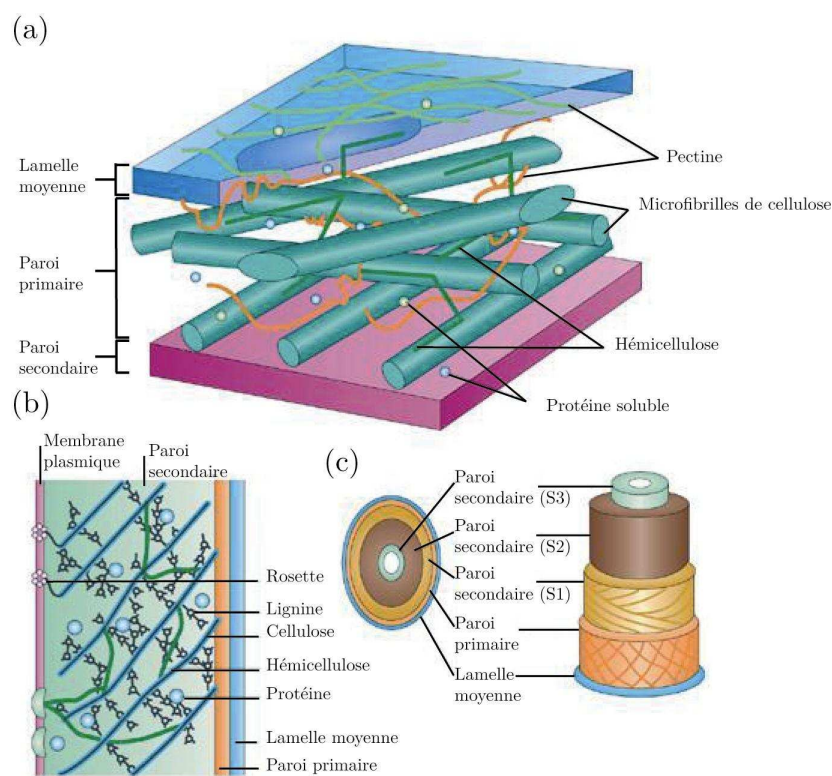
Toutes les études présentées dans les chapitres précédents portaient sur des échantillons isotopiquement enrichis. Il n'est malheureusement pas toujours envisageable de posséder de tels échantillons, bien souvent parce qu'il est impossible techniquement de les marquer isotopiquement. C'est par exemple le cas du bois archéologique. Comment marquer des échantillons vieux de plusieurs siècles ? Les techniques de corrélation en deux dimensions ne sont plus alors les mieux adaptées à ces échantillons, le temps nécessaire à l'acquisition devenant très long (de l'ordre de plusieurs jours, allant même jusqu'à la semaine). Il est nécessaire dans ce cas de recourir à d'autres techniques afin, entre autre, d'attribuer les différentes résonances de ces échantillons. L'édition spectrale, qui permet de séparer un spectre en différents « sous-spectres », est l'une de ces techniques.

Ce chapitre de thèse relate notre modeste contribution à un article de revue dédié à la RMN haute résolution du carbone  $^{13}$  comme outil de caractérisation du bois archéologique <sup>337</sup>. Il a pour objectif de recenser les techniques existantes d'édition spectrale comme moyen d'attribution et de comparer leur efficacité sur des échantillons de bois vieux de plusieurs siècles. Nous tenons à souligner que ce chapitre n'a pas pour objet une meilleure compréhension de la biosynthèse, de la structure ou de l'organisation des biopolymère constituant la paroi cellulaire végétale, comme cela est au contraire le cas des chapitres 2 et 3 traitant de la paroi cellulaire bactérienne. Nous consacrerons cependant la première partie de ce chapitre à une brève présentation de la paroi cellulaire végétale, à sa composition chimique et aux propriétés structurales qu'elle confère au bois. Nous verrons ensuite en quoi la conservation de bois archéologiques est difficile et en quoi la RMN en phase solide est un outil puissant pour l'étude de tels échantillons. Enfin, nous décrirons les techniques d'édition spectrales que nous avons testées et en feront une revue critique.

### 8.1 La paroi cellulaire végétale

La paroi cellulaire végétale, entourant la membrane plasmique, est souvent présentée comme composée de trois éléments : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Cf. Figure 8-1). Ses fonctions sont multiples : protection de la cellule, maintien de sa forme, échange nutritionnel, etc. La lamelle moyenne est située à la limite externe de la paroi et permet aux

cellules de s'assembler en tissus. La paroi primaire, souvent caractéristique des cellules jeunes, confère à la cellule la plasticité permettant de se diviser, de s'allonger et de se différencier. La paroi secondaire, quant à elle, est située entre la paroi primaire et la membrane plasmique. Elle est plus rigide que la paroi primaire et apparaît lorsque les cellules végétales perdent leur capacité à croître et à se diviser, pour adopter une structure rigide et apporter un rôle de soutien ou de transport de la sève brute <sup>338</sup>. La paroi cellulaire végétale, de par ses fonctions, peut être comparée à la paroi cellulaire bactérienne et notamment au peptidoglycane (Cf. chapitres 1-3). Cependant, leur composition chimique respective est très différente, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.



**Figure 8-1. La paroi cellulaire végétale. (a) modèle simplifié de la paroi cellulaire primaire, (b) modèle simplifié de la paroi cellulaire secondaire et (c) vue générale de la paroi cellulaire végétale. Illustration traduite de la référence <sup>339</sup>.**

## 8.2 Composition chimique et propriétés structurales du bois

Le bois peut être décrit comme un matériau composite naturel qui est composé de trois constituants : la cellulose (de 40 à 45 %), polymère linéaire de poly- $\beta$ (1-4)-D-glucopyranose, les hémicelluloses (de 20 à 30 %), qui chez le

hêtre par exemple sont composées de poly- $\beta$ (1-4)-D-xylopyranose O-acétylé, et la lignine (de 20 à 30 %), un polymère amorphe tridimensionnel et polyaromatique, composé d'unités monomériques de phénylpropane reliées entre elles par des liaisons éthers. Les cycles benzéniques sont substitués par un ou deux groupes méthoxy, selon l'origine taxonomiques des lignines (Cf. Figure 8-2). Les celluloses et hémicelluloses sont des molécules chirales car synthétisées sous contrôle enzymatique. Au contraire, la lignine, issue d'une réaction radicalaire, existe sous la forme de diastéréoisomères.

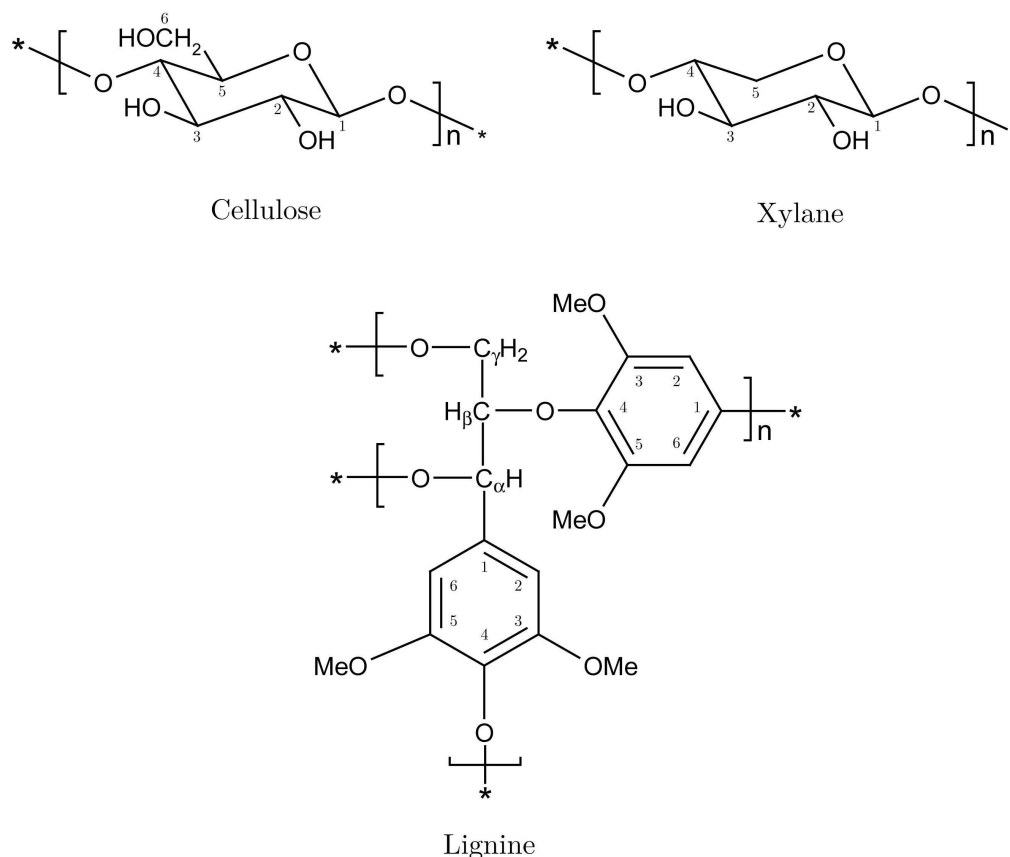
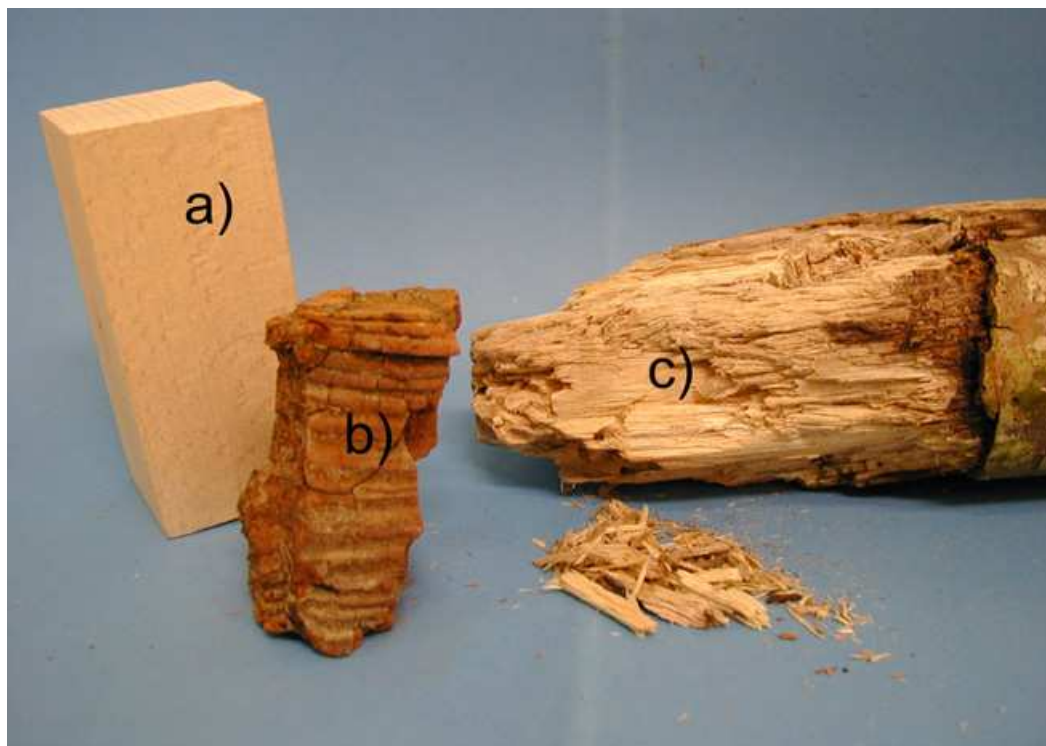


Figure 8-2. Représentation schématique des trois composants principaux du bois.

La cellulose est le seul polymère semi-cristallin présent dans la paroi cellulaire ligno-cellulosique du bois. Les fibres formées par la cellulose sont maintenues entre elles par les hémicelluloses dans la paroi primaire (Cf. Figure 8-1). La paroi secondaire est constituée des mêmes éléments que la paroi primaire, auxquels s'ajoute de la lignine, jouant également ce rôle de soutien. Les hémicelluloses et la lignine peuvent être visualisées comme les contreforts de la cellulose, qui assurent la cohésion des fibres cellulosiques. Durant la croissance de la plante, l'organisation moléculaire de ces différents composants dans la paroi cellulaire mène à des structures morphologiques tridimensionnelles très différentes<sup>340, 341</sup>. Ces différences sont très variables et dépendent de l'espèce

végétale, de l'âge de la plante, et même de la localisation du bois au sein de la plante.

La dégradation biologique ou physico-chimique de l'un de ses trois composants conduit à une altération de la résistance mécanique du bois et modifie profondément son apparence macroscopique, comme illustré en Figure 8-3.



**Figure 8-3.** Changements morphologiques du bois introduits par la dégradation de ses composants : (a) pas de dégradation, (b) dégradation de la cellulose et des hémicelluloses et (c) dégradation de la lignine (Photographie : P.A. Bayle).

### 8.3 Bois et archéologie : potentialité de la RMN haute résolution

#### 8.3.1 Difficultés liées à la conservation de bois archéologiques

La caractérisation et la préservation de bois archéologiques est un domaine actif de recherche, les objets façonnés par l'homme étant de première importance dans l'étude des activités et technologies humaines à travers les âges. Cependant, la détérioration du bois est un processus naturel auquel de nombreux organismes tels que les animaux, les insectes, les champignons ou

les bactéries contribuent <sup>342</sup>. Un morceau de bois peut être dégradé en moins de quelques années dans des conditions aérobies naturelles et ce sans l'intervention de l'homme. Les archéologues et les conservateurs doivent donc faire face à ce problème lors de la découverte et la restauration d'objets archéologiques en bois. La spécificité des objets en bois découverts en milieu humide et anaérobie, tel que l'eau ou la boue, appelés bois gorgés d'eau, est que les processus de dégradation biologique et chimique ne sont pas les mêmes. La dégradation du bois en est drastiquement ralentie <sup>343, 344</sup>. Cette dégradation est encore plus lente dans le cas d'échantillons enfouis sous une couche de sédiments. Cependant, malgré cet avantage, un problème majeur existe : dans les échantillons de bois gorgés d'eau, la paroi cellulaire est sévèrement dégradée et ses composants principaux comme la cellulose sont remplacés par des molécules d'eau. La mesure de la proportion d'eau dans ces échantillons permet de quantifier cette détérioration, la quantité d'eau augmentant avec le niveau de dégradation des échantillons <sup>345, 346</sup>. Cette détérioration entraîne une fragilité extrême au sein du bois, ce qui représente un défi supplémentaire pour les scientifiques en charge de la conservation des bois gorgés d'eau. En effet, toute tentative de sécher ces bois implique un réel risque de détérioration irrémédiable des échantillons, puisque une fois l'eau enlevée, plus aucun composant structurant (les fibres celluloses) n'est présent dans la paroi cellulaire pour maintenir la forme originale des pièces. Ceci est particulièrement vrai pour les objets les plus dégradés. Le principal but de la conservation d'objets en bois gorgés d'eau est donc de définir quels sont les traitements appropriés susceptibles de stabiliser la forme et la taille de l'objet, principalement au niveau de la paroi cellulaire, et ce sur le long terme <sup>344, 347</sup>. La réversibilité du traitement est aussi une propriété demandée de façon récurrente par les conservateurs. En effet, leur but est de conserver dans la mesure du possible le moyen de revenir au matériau non traité.

Actuellement, le moyen de conservation de bois gorgé d'eau le plus communément utilisé est une imprégnation au poly(éthylène glycol) ou PEG, ce qui permet la formation de liaisons hydrogène entre ce dernier et les carbohydrates du bois <sup>348</sup>. Cependant, ces dernières années, différents problèmes sont apparus suite à ce traitement. Par exemple, une dégradation du PEG a été reportée due à des réactions parasites impliquant des impuretés métalliques contenues dans le bois. De telles réactions peuvent compromettre la conservation sur le long terme des objets conservés. Un deuxième exemple est celui d'un navire de guerre suédois du XVII<sup>ème</sup> siècle, le Wasa. Ce bateau, qui sombra en 1628, fut localisé à la fin des années 1950 à la sortie du port de Stockholm. La coque fut renflouée en 1961. La conservation du Wasa aura exigé 17 ans d'imprégnation au PEG suivi de 9 années de séchage lent. Malgré



ce traitement, le Wasa se dégrade petit à petit <sup>349</sup>. Le professeur Ulla Westermarck et Börje Stenberg, de l'université de Luleå en suède, ont suggéré que le traitement d'un bois gorgé d'eau légèrement acide avec du PEG produirait de l'acide formique qui liquéfierait le bois <sup>350</sup>.

### 8.3.2 *La RMN comme outil de caractérisation du bois archéologique*

Avant de pouvoir étudier les modifications structurales apparaissant dans un échantillon de bois archéologique, une analyse qualitative des données obtenues par RMN en phase solide, et donc l'attribution des spectres, est une première étape essentielle. Cette attribution est basée sur un très grand nombre d'études réalisées par RMN en solution représentant un énorme travail tout au long de ces dernières décennies. Il est en effet impossible de solubiliser un échantillon de bois sans que ses différents composants ne subissent de profondes modifications chimiques. L'étude de systèmes modèles, représentant les trois principaux composants du bois que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, a alors grandement aidé à l'attribution des spectres de bois. Ces modèles, synthétisés spécifiquement pour ces études, ont pour rôle de modéliser les unités monomériques des différents constituants du bois mais aussi les liaisons entre ces différents monomères <sup>351, 352</sup>. Il a également été possible d'étudier par RMN en phase liquide des constituants isolés du bois qui ont pu être extraits par des traitements chimiques ou mécaniques <sup>353-355</sup>. Il est à noter cependant que les déplacements chimiques mesurés par RMN en phase liquide peuvent varier comparés à ceux mesurés en phase solide. Les raisons de ces différences sont relativement bien connues. Les variations d'états conformationnels adoptés par les molécules entre la phase liquide et la phase solide sont certainement l'une de ces raisons <sup>356</sup>. L'état du polymère (cristallin ou amorphe), les liaisons hydrogènes ainsi que la présence d'eau dans le matériau peuvent aussi jouer un rôle important <sup>357, 358</sup>. Bien que la structure chimique de la cellulose soit beaucoup plus simple que celle de la lignine, l'étude de ce polymère reste complexe puisqu'il est présent à la fois sous forme cristalline et amorphe et présente différents polymorphes. De plus, leur proportion relative est très variable et dépend de facteurs tels que l'âge de l'échantillon et sa localisation au cœur du bois et même dans la paroi cellulaire elle-même <sup>359-362</sup>.

La RMN haute résolution du carbone 13 en phase solide est plus adaptée à l'étude d'échantillons de bois non modifiés chimiquement ou mécaniquement. Le développement méthodologique important qu'a connu cette méthode ces trente dernières années a été de première importance non seulement pour confirmer les attributions déduites des expériences de RMN en solution mais aussi pour la mise en évidence de signaux non attribués. Les premiers spectres

de bois et des ses composants isolés ont pu être enregistrés par RMN en phase solide il y a de cela 30 ans <sup>363, 364</sup>. Cependant, jusqu'à présent, les échantillons de bois archéologique n'ont pas été très étudiés par la RMN en phase solide <sup>365-367</sup>. Dans deux précédents articles, le laboratoire a montré que cette technique très puissante permet d'étudier les changements structuraux intervenant dans des échantillons de bois gorgés d'eau (ceux-ci sont cependant séchés avant l'analyse RMN) <sup>368, 369</sup>. Elle permet notamment d'évaluer le niveau de dégradation du bois et a mis en évidence le fait que suite à une exposition prolongée à l'eau, la cellulose et les hémicelluloses sont très dégradées alors que la lignine reste intacte.

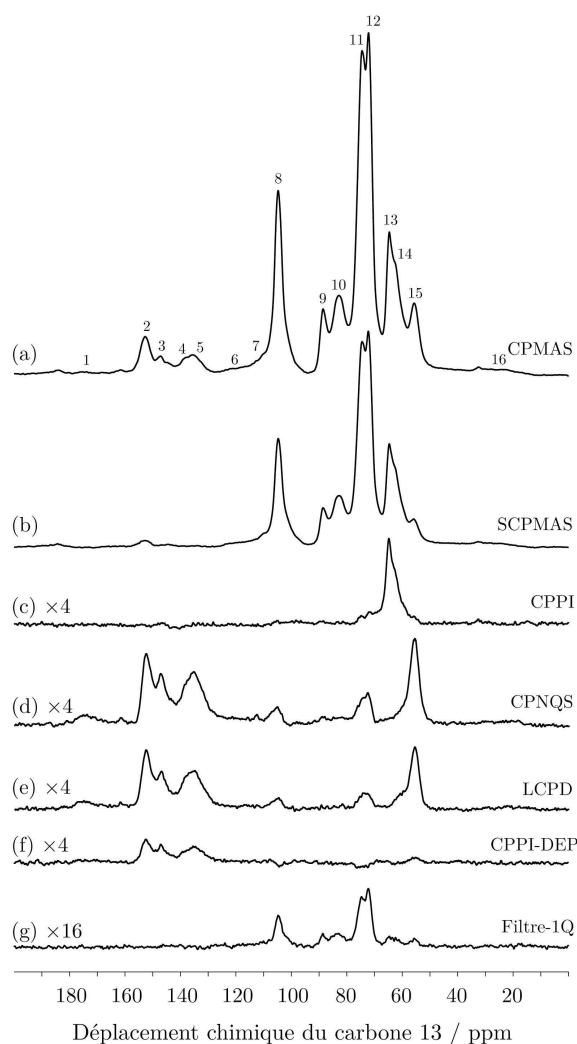
La RMN en phase solide peut aussi être un outil puissant pour étudier les objets archéologiques en bois après traitement au PEG. Elle permet de mesurer la quantité de PEG imprégné dans le bois mais aussi d'étudier et de quantifier les interactions de ce polymère avec les constituants du bois. Le fait que près de 70 % du PEG n'interagisse pas avec le bois pourrait expliquer pourquoi les échantillons, et spécialement les échantillons très dégradés, restent très fragiles malgré l'imprégnation au PEG <sup>370</sup>.

Cependant, la lecture et l'attribution des spectres de matériaux lignocellulosiques est rendue très complexe par la superposition importante de signaux provenant des différents constituants du bois. Des séquences d'impulsions qui peuvent séparer un spectre 1D en différents sous-spectres sont alors intéressantes. Ces techniques sont appelées des méthodes d'édition spectrale et permettent de confirmer l'attribution et de mettre en évidence de nouveaux signaux.

## 8.4 Edition spectrale en archéologie

L'édition spectrale en RMN en phase solide repose sur l'un de ces trois mécanismes : les interactions dipolaires entre les protons et les carbones, la relaxation des protons ou des carbones, et plus récemment les interactions scalaires entre les protons et les carbones.

La capacité de ces différentes méthodes à séparer efficacement les différentes résonances constituant un spectre de bois archéologique est comparée dans cette partie. Il n'est bien sûr pas possible d'être exhaustif, les références étant nombreuses dans le domaine de l'édition spectrale <sup>259, 371-382</sup>.



**Figure 8-4.** Comparaison de spectres obtenus par édition spectrale en utilisant les séquences présentées en Figure 8-5 sur un échantillon de bois archéologique. Les principales caractéristiques de ces séquences sont résumées dans la Table 8-1 et expliquées dans le corps du texte. Spectres (a) CPMAS, (b) SCPMAS, (c) CPPI, (d) CPNQS, (e) LCPD, (f) CPPI-DEP et (g) Filtre-1Q. Les expériences (a) à (f) ont été réalisées sur un spectromètre Bruker, équipé d'une sonde double résonance 7mm avec  $\omega_H/2\pi = 200$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 4$  kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type TPPM a été utilisé, avec une force de champ rf de 83 kHz. 9200 scans ont été enregistrés. Les temps de contact de polarisation croisée utilisés étaient les suivants : (a), (d) et (e) 1 ms, (b) et (c) 40  $\mu$ s et (f) 400  $\mu$ s. Le temps d'évolution  $\tau$  était de 80  $\mu$ s en (d) et le temps de dépolarisation  $\tau_{DE}$  de 100  $\mu$ s lors des expériences (e) et (f). Le temps d'inversion de polarisation  $\tau_{PI}$  était de 37  $\mu$ s en (c) et de 180  $\mu$ s en (f). L'expérience (g) a été réalisée sur un spectromètre Bruker, équipé d'une sonde triple résonance 4mm avec  $\omega_H/2\pi = 400$  MHz et  $\omega_r/2\pi = 12$  kHz. Pendant l'acquisition, du découplage hétéronucléaire de type TPPM <sup>129</sup> a été utilisé, avec une force de champ rf de 100 kHz. 9200 scans ont été enregistrés. Le temps de contact de polarisation croisée utilisé était de 1 ms. Le temps d'évolution était calibré à 3,2 ms et synchronisé avec la rotation. Le découplage homonucléaire utilisé était de type FSLG <sup>383</sup>.

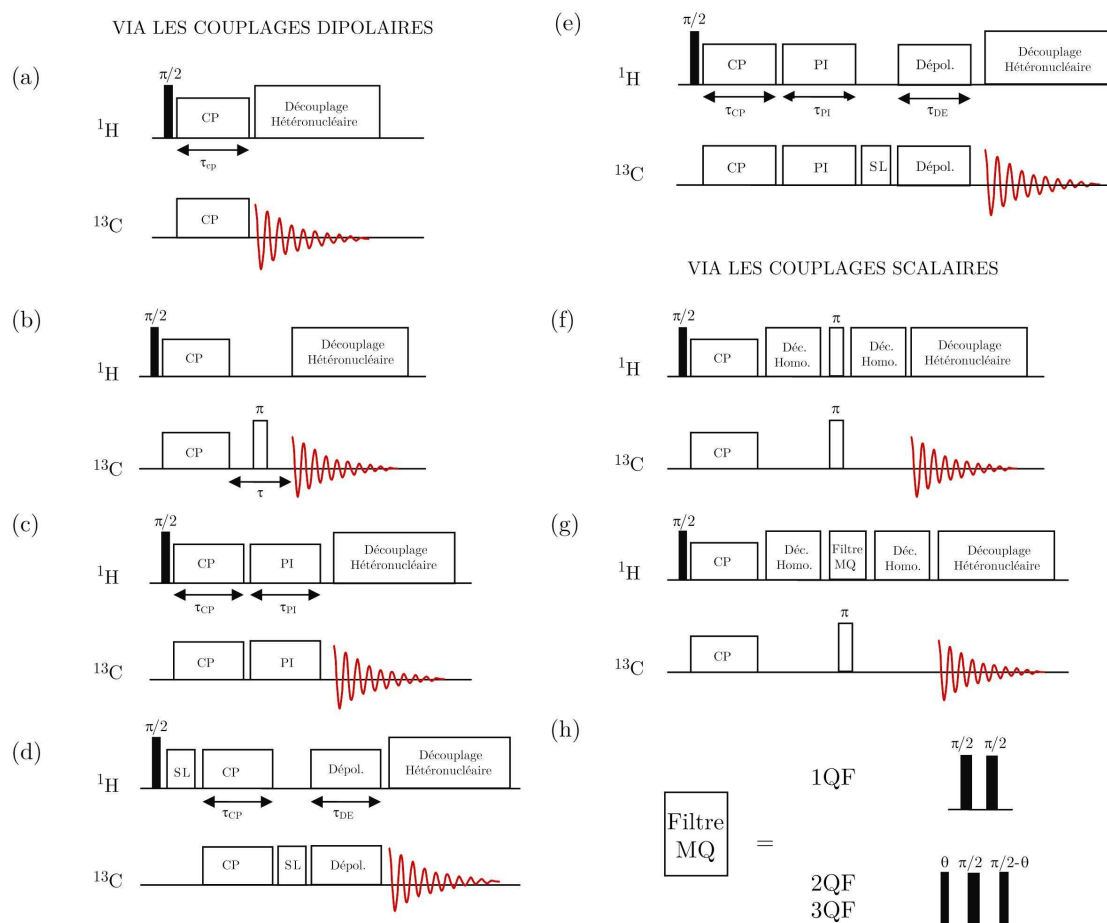
Nous avons donc décidé de ne comparer que les séquences (1) utilisées en archéologie, (2) nous permettant de confirmer une attribution et (3) faciles à mettre en place sur un spectromètre, même pour une personne n'utilisant la RMN qu'en routine. Il est à noter que d'autres stratégies d'édition se basant sur les propriétés de relaxation des différents composants du bois, pour lesquels les temps de relaxation peuvent être très différents, ont été proposées. Ces méthodes ont permis d'identifier la cellulose cristalline dans des échantillons de bois. La méthode appelée PSRE pour « Proton Spin Relaxation spectral Edition » a été quant à elle utilisée pour séparer les constituants cellulosiques des non-cellulosiques<sup>380, 384-387</sup>. Il ne sera pas traité de ces méthodes dans ce chapitre.

Les spectres obtenus par les différentes méthodes d'édition spectrale que nous avons étudiées ont été comparés au spectre de référence enregistré par polarisation croisée, comme illustré en Figure 8-4.

#### 8.4.1 Séquences utilisant les couplages dipolaires

La première méthode qui a été testée est appelée « SCPMAS » pour « Short Cross Polarization Magic Angle Spinning ». Cette séquence est exactement identique à la polarisation croisée (Cf. Figure 8-5 (a)), mais le temps de contact entre les protons et les carbones est maintenu volontairement très court (ici à 40  $\mu$ s). Ceci permet de ne polariser que les carbones ayant beaucoup de protons attachés mais ne possédant pas une grande mobilité. Il est ainsi possible de fortement réduire l'intensité des pics correspondant à des carbones quaternaires, tels que les carbones des groupes carbonyles (sans proton attaché) ou aux  $\text{CH}_3$  (très mobiles) sans toutefois les voir disparaître totalement (Cf. Figure 8-4 (b)). Cette séquence possède l'avantage d'être facile à mettre en place.

Une deuxième méthode que nous avons testée est appelée CPPI pour « Cross Polarization combined with Polarization Inversion »<sup>388, 389</sup>. Cette technique est presque identique à la polarisation croisée, mais après que les protons et les carbones ont été mis en contact, la phase du canal proton est inversée de 180 degrés, ce qui permet d'inverser la température de spins des protons (Cf. Figure 8-5 (c)). Les protons et les carbones ne vont plus alors être à l'équilibre thermique et un transfert d'énergie a lieu à nouveau jusqu'à ce qu'une nouvelle température de spin commune soit atteinte. La vitesse à laquelle ce nouvel équilibre sera atteint dépend du nombre de protons attachés.



**Figure 8-5.** Séquences d'impulsions permettant l'édition spectrale via les couplages dipolaires : (a) CPMAS avec des temps de contact proton-carbone de durée variable, (b) expérience de déphasage dipolaire CPNQS, (c) CPMAS combinée à une inversion de polarisation, CPPI, (d) CPMAS avec temps de contact long combinée à une dépolarisation, LCPD, (e) inversion de polarisation combinée à une dépolarisation, CPPI-DEP. Séquences d'impulsions permettant l'édition spectrale via les couplages scalaires : (f) « Attached Proton Test », APT, (g) et (h) séquences à filtre multi-quantum J-MQF. Les abréviations CP, PI, SL, Dépol. et Déc. Homo. désignent les termes polarisation croisée, inversion de polarisation, spin lock, dépolarisation et découplage homonucléaire, respectivement.  $\tau$  est le temps de déphasage dipolaire,  $\tau_{\text{CP}}$  le temps de polarisation croisée,  $\tau_{\text{PI}}$  le temps d'inversion de polarisation,  $\tau_{\text{DE}}$  le temps de dépolarisation et  $\tau_{\text{SL}}$  sont les temps de spin-lock additionnel.

En choisissant de façon appropriée les temps de contact pendant les étapes de CP et de PI (typiquement 40  $\mu\text{s}$  dans les deux cas), il est possible de supprimer complètement les signaux correspondant à des  $\text{CH}_3$ , des CH et des carbones non protonés, et donc d'obtenir un spectre possédant uniquement des résonances de méthylène (Cf. Figure 8-4 (c)). Les pics des  $\text{CH}_3$  et des carbones non protonés ne sont pas polarisés lors de l'étape courte de CP, alors que les

CH sont annulés lors de l'étape d'inversion de polarisation. L'inconvénient de cette méthode est que, malgré son implémentation assez aisée, la détermination du délai d'inversion de polarisation permettant d'annuler proprement les résonances des CH peut être assez longue. En effet, il est nécessaire de réaliser cette calibration sur l'échantillon étudié lui-même et non sur une molécule modèle, ce délai étant dépendant de l'échantillon. Cette étape peut donc prendre beaucoup de temps si l'échantillon étudié est peu sensible.

La séquence de déphasage dipolaire CPNQS utilise le fait que les interactions dipolaires proton-carbone sont très importantes dans le cas de carbones directement liés à des protons. Cet effet est utilisé pour supprimer les résonances des CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>. Pour ce faire, un délai sans découplage hétéronucléaire est introduit entre l'étape de polarisation croisée et le début de l'acquisition sous découplage <sup>390</sup>. Afin d'obtenir un signal en absorption, l'évolution sous le déplacement chimique est refocalisée par une impulsion de 180 degrés sur le canal carbone (Cf. Figure 8-5 (b)). L'avantage de cette méthode est qu'elle est très facile à mettre en place. Cependant, les spectres peuvent être pollués par des pics correspondant aux CH<sub>3</sub>. En effet, la rotation très rapide de ces groupes sur eux-mêmes réduit fortement la valeur du couplage dipolaire proton-carbone. Malgré tout, leur déplacement chimique étant très différent de celui des carbonyles et des carbones quaternaires, il est assez facile de différencier ces deux types de résonances (Cf. Figure 8-4 (d)).

Une autre technique testée est la dépolarisation, appelée ici LCPD pour « Long Cross Polarisation and Depolarization » (Cf. Figure 8-5 (d)) <sup>391</sup>. Après un temps de polarisation croisée suffisamment long pour polariser les carbones quaternaires et les CH<sub>3</sub> (mobiles), le champ appliqué sur le canal proton est mis à zéro, afin de dépolariser les protons. Les atomes de carbones et protons sont ensuite remis en contact pendant un court délai afin qu'un nouvel équilibre soit rétabli pour les CH et CH<sub>2</sub>. Cette méthode permet donc d'annuler les résonances des méthynes et méthylènes (Cf. Figure 8-4 (e)). L'avantage de cette technique est qu'elle est facile à utiliser. Néanmoins, il est possible d'observer des pics de CH résiduels.

La séquence intitulée CPPI-DEP pour « Cross Polarization combined with Polarization Inversion and Depolarization » permet d'obtenir un spectre présentant uniquement des résonances de carbones quaternaires (Cf. Figure 8-4 (f)) <sup>392</sup>. Pour cela, tous les carbones sont tout d'abord polarisés par polarisation croisée (temps de contact de 400  $\mu$ s). Cette étape est suivie par une étape d'inversion de polarisation où le délai  $\tau_{PI}$  est choisi de façon à annuler les signaux des groupes méthyles. Finalement, les signaux des carbones CH et CH<sub>2</sub> sont annulés par dépolarisation (Cf. Figure 8-5 (e)). Cette méthode souf-

fre des mêmes inconvénients que la séquence CPPI : les différentes calibrations sont longues, les délais dépendants de l'échantillon étudié.

#### 8.4.2 Séquences utilisant les couplages scalaires

Nous avons finalement testé une méthode utilisant les couplages scalaires entre les protons et les carbones. Cette technique, appelée « Filtre Multi-Quantum » ou filtre-MQ (Cf. Figure 8-5 (g) et (h))<sup>393</sup>, est très similaire à la séquence « Attached Proton Test » (APT) (Cf. Figure 8-5 (f))<sup>394</sup>. Cette dernière technique a l'avantage, contrairement aux techniques basées sur le couplage dipolaire, de différencier les résonances des CH des signaux correspondant aux CH<sub>2</sub>, ces groupements possédant des couplages dipolaires aux protons assez similaires. De plus, toute technique se basant sur les couplages scalaires permet la détection correcte et dépourvue d'artefacts de signaux provenant de spins appartenant à des bouts de chaînes très flexibles, où les interactions dipolaires sont très réduites. Pendant la période  $2\tau$ , du découplage homonucléaire de type FSLG est appliqué de façon à éliminer les couplages dipolaires proton-proton<sup>383</sup>. Grâce à la rotation à l'angle magique et à l'application simultanée d'une impulsion  $\pi$  sur les voies proton et carbone au milieu de la période  $2\tau$ , les cohérences de carbone évoluent uniquement sous le couplage scalaire hétéronucléaire pendant ce délai. L'intensité de l'aimantation évolue différemment, en fonction de la multiplicité du carbone. Il est ainsi possible d'obtenir un spectre présentant les résonances des carbones quaternaires et des CH<sub>2</sub> en positif, alors que les pics des CH et CH<sub>3</sub> apparaissent en négatif. La principale faiblesse de cette technique est le fait qu'il est assez difficile de différencier les résonances des CH et de celles des CH<sub>3</sub>. Le but de la séquence filtre MQ est de lever cette ambiguïté. Pour se faire, l'impulsion  $\pi$  sur le canal proton est remplacée par un filtre multi-quanta. Ainsi, l'utilisation de la séquence filtre-1Q permet l'observation des résonances des CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> (Cf. Figure 8-4 (g)), la séquence filtre-2Q l'observation des pics des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> et la séquence filtre-3Q l'observation des pics des CH<sub>3</sub> uniquement.

Les principaux inconvénients de la méthode Filtre-1Q est que la calibration du découplage homonucléaire est plutôt longue et non aisée pour un utilisateur de RMN en routine et que les pics des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> sont très peu intenses. Les méthodes filtre-2Q et filtre-3Q souffrent d'une trop grande insensibilité.

Les principales caractéristiques de toutes ces séquences d'édition spectrale sont rassemblées en Table 8-1.

Séquence utilisée	Spectre correspondant en Figure 8-4	Résonances attendues	Efficacité (%)	Observations
CPMAS	a	toutes	100	-
SCPMAS	b	CH, CH <sub>2</sub>	64	→ C <sub>quat</sub> et CH <sub>3</sub> toujours présents mais avec une intensité réduite → facile à mettre en place
CPPI	c	CH <sub>2</sub>	16	→ pics des CH <sub>2</sub> uniquement → difficile à mettre en place, $\tau_{PI}$ dépendant de l'échantillon
CPNQS	d	C <sub>quat</sub> , C mobile	56	→ facile à mettre en place
LCPD	e	C <sub>quat</sub> , C mobile	44	→ quelques pics CH résiduels → facile à mettre en place
CPPI-DEP	f	C <sub>quat</sub>	21	→ pics des C <sub>quat</sub> uniquement → calibration longue et difficile, $\tau_{PI}$ dépendant de l'échantillon
Filtre-1Q	g	CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	7	→ pics des CH <sub>2</sub> et CH <sub>3</sub> très peu intenses → calibration du découplage homonucléaire plutôt long

**Table 8-1.** Principales caractéristiques des séquences d'édition spectrale des résonances du carbone utilisées sur des échantillons de bois archéologique.



## 8.5 Attribution des spectres de bois archéologique obtenus par RMN en phase solide de résonance du carbone

Les principaux pics du spectre de résonance du carbone enregistré sur un échantillon de bois archéologique peu dégradé ont été parfaitement identifiés il y a plus de vingt ans (Cf. Figure 8-4 (a))<sup>395-397</sup>. Le signal numéro 16 à 21 ppm est attribué au carbone des CH<sub>3</sub> appartenant aux groupes acétyle des hémicelluloses. La région entre 60 et 105 ppm est dominée par des signaux très intenses (8 à 14), qui sont attribués majoritairement aux carbohydrates de la cellulose. Les hémicelluloses donnent aussi du signal dans cette zone. Un point intéressant est la présence de deux signaux, 9 et 10, à 88 et 83 ppm, attribués aux C<sub>4</sub> des allomorphes de la cellulose. Le signal à 83 ppm indique la présence de cellulose à l'état amorphe et celui à 87 ppm la présence de cellulose cristalline. Cependant, ces signaux et ceux appartenant aux différents carbones aliphatiques de la lignine se superposent. Dans cette région, le seul signal qui puisse être attribué spécifiquement est le pic numéro 15 à 55 ppm, correspondant aux groupes méthoxy des unités aromatiques de la lignine. Le signal numéro 8 à 105 ppm est attribué principalement aux C<sub>1</sub> des sucres, bien qu'il puisse y avoir dans cette région une superposition avec les signaux correspondants cette fois aux carbones aromatiques de la lignine. La région comprise entre 105 et 160 ppm est spécifique aux carbones aromatiques de la lignine. Par exemple, le signal numéro 2 à 152 ppm est attribué aux C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub> de la syringyle impliquée dans des structures du type  $\beta$ -O-4. L'épaule 3 est quant à lui principalement attribué aux mêmes carbones appartenant à ces mêmes structures mais non-éthérifiées. Les intensités relatives de ces deux pics larges permettent d'estimer la déplétion des liaisons  $\beta$ -O-4 au sein du polymère de lignine. Enfin, à 174 ppm apparaît le signal 1 correspondant aux carbonyles des groupes acétoxy des hémicelluloses. L'attribution complète est résumée dans la Table 8-2.

Résonance	Déplacement chimique (ppm)	Attribution
1	172	Carbohydrates : $\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{R}$ , $\text{CH}_3-\underline{\text{C}}\text{OO}$
2	152,6	Lignine : S3 (e), S5 (e)
3	147	Lignine : S3 (ne), S5 (ne), G1, G4
4	136	Lignine : S1 (e), S4 (e), G1 (e)
5	134,3	Lignine : S1 (ne), S4 (ne), G1 (e)
6	121	Lignine : G6
7	114-106	Lignine : G5, G6, S2, S6
8	104,8	Carbohydrates : C1
9	88,7	Carbohydrates : C4
10	83,8	Lignine : C <sub><math>\beta</math></sub> ; Carbohydrates : C4
11	74,8	Lignine : C <sub><math>\alpha</math></sub> ; Carbohydrates : C2, C3, C5
12	72,2	Carbohydrates : C2, C3, C5
13	64,7	Carbohydrates : C6
14	61,6	Lignine : C <sub><math>\gamma</math></sub>
15	55,7	Lignine : $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$
16	21	Carbohydrates : $\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{COO}$

**Table 8-2.** Attribution des résonances du spectre CPMAS d'échantillons de bois modernes et archéologiques. Le numéro attribué à chaque résonance correspond au numéro indiqué sur la Figure 8-4 (a). Les différentes abréviations correspondent aux noms suivants: S, syringyle (noyau aromatique possédant deux groupements méthoxy) ; G, guaiacyle (noyau aromatique possédant un seul groupement méthoxy) ; ne, éthers arylglycérol- $\beta$ -aryl non-éthérifiés ; e, éthers arylglycérol- $\beta$ -aryl éthérifiés.

## 8.6 Conclusion

Nous avons donc vu que la RMN en phase solide est un outil précieux pour l'étude d'échantillons de bois archéologiques. Elle permet d'étudier les modifications structurales apparaissant au sein du bois après un séjour dans l'eau et suite à une imprégnation au PEG. Ces études nécessitent tout d'abord une étape d'attribution des spectres de bois, rendue possible entre autre par les différentes techniques d'édition spectrales recensées ici. Nous espérons que notre étude comparative de ces méthodes servira activement aux personnes intéressées par l'étude d'échantillons de matériau ligno-cellulosique, que ce soit par exemple du bois archéologique dans le cas des archéologues et conservateurs ou bien des échantillons de biomasse dans le domaine de l'énergie.



## ***Annexes***



## Annexe A

---

### Attribution du peptidoglycane



		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> 168	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumo-</i> <i>niae</i>
GlcNAc	C1	100,9	101		
	C2	55,6	56,2		
	C3	72,3	72,8		
	C4	79,8	80,2		
	C5	75,2	75,3		
	C6	60,3	60,9		
	CO (NHAc)	174, 9	175,2	175,4	
	CH <sub>3</sub> (NHAc)	23,00	23,0	23,0	
MurNAc	C1	101,8	102,1		
	C2	54,8	54,9		
	C3	79,2	79,9		
	C4	72,2			
	C5	75,2			
	C6	60,3			
	CO (NHAc)	174,9	175,2	176	
	CH <sub>3</sub> (NHAc)	23,0	23,0	23,0	
Lac	CO	175,0	175,2		
	C <sub>α</sub>	78,1	78,7		
	CH <sub>3</sub>	18,1	18,5		
L-Ala D-Ala	C <sub>α</sub>	50,1	50,7	50,4	50,8 / 50,1
	C <sub>β</sub>	17,5	17,3	17,1	17,5 / 17,9
	CO	174,9	175,9	176	176,0 / 173,0
γ-D-Glu	C <sub>α</sub>	54,7	55,0	53,4	
	C <sub>β</sub>	28,6	29,0		
	C <sub>γ</sub>	32,3	32,5	32	
	CO	175,8	176,4 / 175,5	175,5	
	CO <sup>2-</sup> / CONH <sub>2</sub>	178,0	178,3		
<i>méso</i> - A <sub>2</sub> pm ou Lys	C1 / C1' ou C <sub>α</sub>	54,8 / 54,5	55,7 / 53,7	54,7	
	C2 / C2' ou C <sub>β</sub>	31,2	31,8 / 31,1	31,1	
	C3 ou C <sub>γ</sub>	21,5	22,5 / 21,5	22,9	
	C <sub>δ</sub>				28,5
	C <sub>ε</sub>			39,6	
	CO / CO'	174,4 / 173,6	179,5 / 177,5 175,5 / 172,9	175,1	
Gly	C <sub>α</sub>			43,2	
	CO			172,5 / 171,4	

Table 1. Déplacements chimiques du carbone du peptidoglycane de différentes espèces bactériennes (en ppm), à 283 K et pH 7,5 (solution tampon HEPES 50 mM).





## Annexe B

---

### Attribution des acides téichoïques

		<i>B. subtilis</i> ATCC 168 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	<i>S. pneumoniae</i> <sup>c</sup>
Ribitol-P <sup>d</sup>	C1		67,1 (66,8)	
	C2		71,2 (70,2)	
	C3		71,3 (71,7)	
	C4		80,0 (70,2)	71,5
	C5		65,3 (66,8)	67,4
Glycérol-P <sup>d</sup>	C1	66,1 (67,3)		
	C2	76,2 (71,6)		
	C3	65,4 (63,1)		
β-GlcNAc	C1		101,9	
	C2		56,2	
	C3		74,6	
	C4		70,6	
	C5		76,2	
	C6		61,2	
	CO (NHAc) CH <sub>3</sub> (NHAc)		175,4 23,0	
α-GlcNAc	C1	95,1		
	C2	49,5		
	C3	78,2		
	C4	69,0		
	C5	72,7		
	C6	61,4		
	CO (NHAc) CH <sub>3</sub> (NHAc)	175,2 23,0		
β-Glc	C1	105,0		104,8
	C2	73,8		73,6
	C3			76,3
	C4			69,6
	C5			75,1
	C6			64,9
α-Glc	C1	98,5		
	C2	72,5		
	C3	74,0		
	C4	70,7		
	C5	72,9		
	C6	61,4		
β-GalNAc	C1			101,9
	C2			51,4
	C3			75,5
	C4			64,0
	C5			74,2
	C6			65,2

	CO (NHAc)			175,4
	CH <sub>3</sub> (NHAc)			23,0
<b><math>\alpha</math>-GalNAc</b>	C1			94,1
	C2			50,2
	C3			67,6
	C4			77,3
	C5			71,3
	C6			64,3
	CO (NHAc)			175,4
	CH <sub>3</sub> (NHAc)			23,0
<b>AAT-Gal</b>	C1			98,9
	C2			49,0
	C3			75,8
	C4			55,5
	C5			64,1
	C6			16,3

Table 1. Déplacements chimiques du carbone des acides téichoïques de différentes espèces bactériennes (en ppm), à 283 K et pH 7,5 (solution tampon HEPES 50 mM).

<sup>a</sup> Le constituant principal des acides téichoïques de *B. subtilis* est le 1,3-poly-[2-( $\alpha$ -glucopyranosyl)glycérol-diphosphate]. Les constituants minoritaires contiennent à la fois des groupes 1,3-glycérol-diphosphate non substitués ainsi que des groupes 1,3-glycérol-diphosphate substitués par des  $\beta$ -glucosyl et des (2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -glucopyranosyl) (déplacements chimiques entre parenthèses).

<sup>b</sup> Le constituant principal des acides téichoïques de *S. aureus* est le 1,5-poly-[4-*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -glucopyranosyl)ribitol-diphosphate]. Le constituant minoritaire contient des groupes poly-phosphoribitol non substitués (déplacements chimiques entre parenthèses).

<sup>c</sup> Le système de spin du ribitol n'a pas pu être attribué entièrement à cause des multiples chevauchements de pics de corrélation autour de 70 ppm. La stéréochimie du carbone C1 du glucopyranoside a été déduite du déplacement chimique du pic correspondant. L'attribution de GlcNAc versus Glc est basée sur le déplacement chimique du C2. Celle de AAT-Gal est non ambiguë (déplacement chimique du C6 très spécifique).

<sup>d</sup> Le ribitol et le glycérol sont phosphorylés en position 1,5 et 1,3, respectivement.



## Annexe C

---

Tenseurs sphériques irréductibles

Interactions dipolaires

Recouplage TSAR et termes auto-croisés

Opérateurs de spin fictif



- Tenseurs sphériques irréductibles pour les spins  $i$ ,  $j$  et  $k$  :

$$\begin{aligned}
T_{10}^i &= S_{iz} \\
T_{1\pm1}^i &= \mp \frac{1}{\sqrt{2}} S_i^\pm \\
T_{00}^{jk} &= -\frac{1}{\sqrt{3}} \overline{S_j} \cdot \overline{S_k} \\
T_{10}^{jk} &= \frac{-1}{2\sqrt{2}} (S_j^+ S_k^- - S_j^- S_k^+) \\
T_{1\pm1}^{jk} &= \frac{-1}{2} (S_j^\pm S_{kz} - S_{jz} S_k^\pm) \\
T_{20}^{jk} &= \frac{1}{\sqrt{6}} (3S_{jz} S_{kz} - \overline{S_j} \cdot \overline{S_k}) \\
T_{2\pm1}^{jk} &= \mp \frac{1}{2} (S_j^\pm S_{kz} + S_{jz} S_k^\mp) \\
T_{2\pm2}^{jk} &= \frac{1}{2} S_j^\pm S_k^\pm
\end{aligned}
\tag{Equation 1}$$

- Expression des interactions dipolaires dépendantes du temps

$$\omega_{\lambda,ij}^0 = 0 \tag{Equation 2}$$

$$\omega_{\lambda,ij}^1 = -\frac{\omega_{\lambda,ij}}{2\sqrt{2}} \sin(2\beta) e^{-i\gamma} = \omega_{\lambda,ij}^{-1*} \tag{Equation 3}$$

$$\omega_{\lambda,ij}^2 = -\frac{\omega_{\lambda,ij}}{4} \sin^2(\beta) e^{-i2\gamma} = \omega_{\lambda,ij}^{-2*} \tag{Equation 4}$$

$\lambda$  représente le type d'interactions dipolaires homonucléaire ou hétéro-nucléaire.  $(\beta, \gamma)$  sont les angles d'Euler et le chiffre en exposant  $(0, \pm1, \pm2)$  représente la composante spatiale liée à la rotation à l'angle magique et non une puissance.



- **Expression du recouplage TSAR :**

$$\begin{aligned} \omega_{ZQ, \delta p_0}^{\text{TSAR}} = & \left( \frac{\text{Re}(\omega_{AH}^1 \omega_{HB}^{-1})}{\omega_r} \lambda(1, p, p_H) + \frac{\text{Re}(\omega_{AH}^2 \omega_{HB}^{-2})}{\omega_r} \lambda(2, p, p_H) \right) \\ & + i \left( \frac{\text{Im}(\omega_{AH}^1 \omega_{HB}^{-1})}{\omega_r} \sigma(1, p, p_H) + \frac{\text{Im}(\omega_{AH}^2 \omega_{HB}^{-2})}{\omega_r} \sigma(2, p, p_H) \right) \end{aligned} \quad \text{Equation 5}$$

avec :

$$\begin{aligned} \lambda(m, p, p_H) &= \left( \frac{-(p + p_H)}{m^2 - (p + p_H)^2} + \frac{-(p_H - p)}{m^2 - (p_H - p)^2} \right) \\ \sigma(m, p, p_H) &= \left( \frac{m}{m^2 - (p_H + p)^2} - \frac{m}{m^2 - (p_H - p)^2} \right) \end{aligned} \quad \text{Equation 6}$$

- **Opérateurs de spin fictif ZQ pour les spins  $k$  et  $l$  :**

$$\begin{aligned} I_{kl,x}^{(23)} &= \frac{1}{2} (2I_{kx}I_{lx} + 2I_{ky}I_{ly}) = \frac{1}{2} (I_k^+ I_l^- + I_k^- I_l^+) = -(T_{11}^k T_{1-1}^l + T_{1-1}^k T_{11}^l) \\ I_{kl,y}^{(23)} &= \frac{1}{2} (2I_{ky}I_{lx} - 2I_{kx}I_{ly}) = \frac{i}{2} (-I_k^+ I_l^- + I_k^- I_l^+) = i (T_{11}^k T_{1-1}^l - T_{1-1}^k T_{11}^l) \\ I_{kl,z}^{(23)} &= \frac{1}{2} (I_{kz} - I_{lz}) = \frac{1}{2} (T_{10}^k - T_{10}^l) \end{aligned} \quad \text{Equation 7}$$

- **Expressions des termes auto-croisés :**

Le terme auto-croisé du terme 2 avec lui-même de l'équation 7-6, correspondant au couplage dipolaire A-<sup>1</sup>H, peut être écrit comme suit :

$$\begin{aligned} \tilde{H}_{2 \times 2}^{(2)} &= \frac{1}{\omega_r} \left[ \omega_{AH}^1 \omega_{HA}^{-1} \chi(1, p, p_H) + \omega_{AH}^2 \omega_{HA}^{-2} \chi(2, p, p_H) \right] T_{10}^A \\ &+ \frac{1}{\omega_r} \left[ \omega_{AH}^1 \omega_{HA}^{-1} \kappa(1, p, p_H) + \omega_{AH}^2 \omega_{HA}^{-2} \kappa(2, p, p_H) \right] T_{10}^H \end{aligned} \quad \text{Equation 8}$$

avec :

$$\begin{aligned}\chi(m, p, p_H) &= -\frac{1}{2} \left( \frac{(p_H + p)}{m^2 - (p_H + p)^2} - \frac{(p_H - p)}{m^2 - (p_H - p)^2} \right) \\ \kappa(m, p, p_H) &= -\frac{1}{2} \left( \frac{(p_H + p)}{m^2 - (p_H + p)^2} + \frac{(p_H - p)}{m^2 - (p_H - p)^2} \right)\end{aligned}\quad \text{Equation 9}$$

De la même façon, il est possible d'obtenir le terme auto-croisé du terme 3 avec lui-même de l'équation 7-6, correspondant au couplage dipolaire  $^1\text{H}-B$ , en remplaçant l'index  $A$  par  $B$  dans l'équation 8.

Afin d'avoir une vision complète des contributions longitudinales, il est également nécessaire de calculer les termes auto-croisés des termes correspondant aux tenseurs de déplacement chimique des spins  $A$ ,  $B$  et  $H$  avec eux-mêmes :

$$\begin{aligned}\bar{\bar{H}}_{4 \times 4}^{(2)} + \bar{\bar{H}}_{5 \times 5}^{(2)} + \bar{\bar{H}}_{6 \times 6}^{(2)} &= \frac{1}{\omega_r} \left[ \frac{(\omega_A^0)^2}{2p} + \xi(1, p) \omega_A^1 \omega_A^{-1} + \xi(2, p) \omega_A^2 \omega_A^{-2} \right] T_{10}^A \\ &+ \frac{1}{\omega_r} \left[ \frac{(\omega_B^0)^2}{2p} + \xi(1, p) \omega_B^1 \omega_B^{-1} + \xi(2, p_B) \omega_B^2 \omega_B^{-2} \right] T_{10}^B \\ &+ \frac{1}{\omega_r} \left[ \frac{(\omega_H^0)^2}{2p_H} + \xi(1, p_H) \omega_H^1 \omega_H^{-1} + \xi(2, p_H) \omega_H^2 \omega_H^{-2} \right] T_{10}^H\end{aligned}\quad \text{Equation 10}$$

où

$$\xi(m, p) = \frac{p}{(p^2 - m^2)} \quad \text{Equation 11}$$

Les termes auto-croisés provenant des couplages  $J$  sont également présents mais peuvent généralement être négligés par rapport aux termes auto-croisés dipolaires considérés plus haut. L'hamiltonien réunissant tous les termes auto-croisés peut donc être écrit ainsi :

$$\bar{\bar{H}}_{\text{AUTO}}^{(2)} = \omega_{ZQ}^{\text{AUTO}} I_{\bar{Z}}^{\text{NC},(23)} + \omega_{DQ}^{\text{AUTO}} I_{\bar{Z}}^{\text{NC},(14)} + \lambda T_{10}^H \quad \text{Equation 12}$$

Les expressions analytiques de  $\omega_{ZQ}^{AUTO}$  et  $\omega_{DQ}^{AUTO}$  dépendent des conditions TSAR choisies (ZQ ou DQ,  $\delta p_0$  ou  $\delta p_1$ , etc.). Par exemple, dans le cas d'un mécanisme ZQ  $\delta p_0$  TSAR, ces termes peuvent s'exprimer ainsi :

$$\omega_{ZQ}^{AUTO} = \frac{1}{\omega_r} \left[ \underbrace{\left( \omega_{NH}^1 \omega_{HN}^{-1} - \omega_{CH}^1 \omega_{HC}^{-1} \right) \chi(1, p, p_H) + \left( \omega_{NH}^2 \omega_{HN}^{-2} - \omega_{CH}^2 \omega_{HC}^{-2} \right) \chi(2, p, p_H)}_{\text{Termes auto-croisés ZQ dipolaires}} + \underbrace{\frac{\left( \omega_N^0 \right)^2 - \left( \omega_C^0 \right)^2}{2p} + \xi(1, p) \left( \omega_N^1 \omega_N^{-1} - \omega_C^1 \omega_C^{-1} \right) + \xi(2, p) \left( \omega_N^2 \omega_N^{-2} - \omega_C^2 \omega_C^{-2} \right)}_{\text{Termes auto-croisés ZQ provenant du déplacement chimique}} \right] \quad \text{Equation 13}$$

$$\omega_{DQ}^{AUTO} = \frac{1}{\omega_r} \left[ \underbrace{\left( \omega_{NH}^1 \omega_{HN}^{-1} + \omega_{CH}^1 \omega_{HC}^{-1} \right) \chi(1, p, p_H) + \left( \omega_{NH}^2 \omega_{HN}^{-2} + \omega_{CH}^2 \omega_{HC}^{-2} \right) \chi(2, p, p_H)}_{\text{Termes auto-croisés DQ dipolaires}} + \underbrace{\frac{\left( \omega_N^0 \right)^2 + \left( \omega_C^0 \right)^2}{2p} + \xi(1, p) \left( \omega_N^1 \omega_N^{-1} + \omega_C^1 \omega_C^{-1} \right) + \xi(2, p) \left( \omega_N^2 \omega_N^{-2} + \omega_C^2 \omega_C^{-2} \right)}_{\text{Termes auto-croisés DQ provenant du déplacement chimique}} \right] \quad \text{Equation 14}$$

## Publications

---

**Giffard, M.**, Kern, T., Hediger, S., Amoroso, A., Giustini, C.c., Bui, N.K., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W. & Simorre, J.-P. Dynamics Characterization of Fully Hydrated Bacterial Cell Walls by Solid-State NMR: Evidence for Cooperative Binding of Metal Ions. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 10911-10919 (2010)

**Giffard, M.**, Bardet, M., Bersch, B., Coves, J. & Hediger, S. Impact of selective excitation on carbon longitudinal relaxation: Towards fast solid-state NMR techniques. *Journal of Magnetic Resonance* **200**, 153-160 (2009)

Bardet, M., Gerbaud, G., **Giffard, M.**, Doan, C., Hediger, S. & Le Pape, L. <sup>13</sup>C high-resolution solid-state NMR for structural elucidation of archaeological woods. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55**, 199-214 (2009)

**Giffard, M.**, Hediger, S., Lewandowski, J.R., Bardet M., Simorre J-P., Griffin R., De Paëpe G. Effect of RF phase shift on the Third Spin Assisted Recoupling in solid-state NMR *manuscrit en préparation*

## Communications orales

---

**Joint Euromar 2010 and 17<sup>th</sup> ISMAR conference**, Florence, Italy. *Effect of RF Phase Shift on the Third Spin Assisted Recoupling in Solid-state NMR*  
Giffard, M., Hediger, S., Lewandowski, J.R., Bardet M., Simorre J-P., Griffin R., De Paëpe G.

**Invited by Pr. Dr. Marc Baldus** at the NMR Spectroscopy Research Group, Utrecht University, The Netherlands, 2010. *Biomolecular Solid-state NMR: application to the bacterial cell wall and new methodological approaches*  
Giffard, M., Kern, T., Hediger, S., Amoroso, A., Giustini, C., Bui, N-K., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W., Simorre, J-P., Lewandowski, J., Bardet, M., Simorre, J-P., De Paëpe, G.

**Journée RMN du Grand Sud-Est 2009**, Marseille, France. *Impact of selective excitation on carbon longitudinal relaxation: towards fast solid-state NMR techniques* Giffard, M., Bardet, M., Bersch, B., Coves, J., Hediger, S.

**6th Alpine-Conference on Solid-State NMR**, Chamonix, France, 2009. *Impact of selective excitation on carbon longitudinal relaxation: towards fast solid-state NMR techniques* Giffard, M., Bardet, M., Bersch, B., Coves, J., Hediger, S.

## Posters

---

**Joint Euromar 2010 and 17<sup>th</sup> ISMAR conference**, Florence, Italy. *Effect of RF Phase Shift on the Third Spin Assisted Recoupling in Solid-state NMR* Giffard, M., Hediger, S., Lewandowski, J.R., Bardet M., Simorre J-P., Griffin R., De Paëpe G.

**NMR: a tool for biology IX**, Institut Pasteur, Paris, France, 2010. *Impact of selective excitation on carbon longitudinal relaxation: towards fast solid-state NMR techniques* Giffard, M., Bardet, M., Bersch, B., Coves, J., Hediger, S.

**Journée de Printemps de la Société Chimique de France**, Villeurbanne, France, 2009. *Dynamics and cooperative binding of metal ions in the bacterial cell wall* Giffard M., Kern T., Hediger S., Amoroso A., Giustini C., Joris B., Bougault C., Vollmer W., Simorre J-P.

**XIème Journée Rhône Alpes de RMN**, Villeurbanne, France, 2009. *Effects of selective pulses on the apparent longitudinal relaxation in solid-state NMR* Giffard M., Bardet M., Bersch B., Coves J., Hediger S.

## Prix

---

**Wiley Prize: Magnetic Resonance in Chemistry Award for Young Scientists 2010** *Effect of RF Phase Shift on the Third Spin Assisted Recoupling in Solid-state NMR*

## Fundings

---

This research was supported by the ANR (ANR-08-BLAN-0306-01 and -02).

Financial support by the Access to Research infrastructures activity in the 7<sup>th</sup> Framework Programme of the EC (Contract 228461, EAST-NMR) for conducting the research is gratefully acknowledged (Access to SONNMRLSF-UNIUT, Utrecht, the Netherlands and to CERM-CIRMMP, Florence, Italy).

Financial support from the TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research is gratefully acknowledged (Access to CRMN, Lyon, France).



## Références bibliographiques

---

1. Purcell, E.M., Torrey, H.C. & Pound, R.V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* **69**, 37 (1946).
2. Bloch, F., Hansen, W.W. & Packard, M. Nuclear Induction. *Physical Review* **69**, 127 (1946).
3. Bloch, F. Line-Narrowing by Macroscopic Motion. *Physical Review* **94**, 496 (1954).
4. Bloembergen, N., Purcell, E.M. & Pound, R.V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* **73**, 679 (1948).
5. Solomon, I. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review* **99**, 559 (1955).
6. Overhauser, A.W. Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review* **92**, 411 (1953).
7. Bloembergen, N. On the interaction of nuclear spins in a crystalline lattice. *Physica* **15**, 386-426 (1949).
8. de Gennes, P.G. Sur la relaxation nucléaire dans les cristaux ioniques. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **7**, 345-350 (1958).
9. Knight, W.D. Nuclear Magnetic Resonance Shift in Metals. *Physical Review* **76**, 1259 (1949).
10. Proctor, W.G. & Yu, F.C. The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. *Physical Review* **77**, 717 (1950).
11. Dickinson, W.C. Dependence of the  $F^{19}$  Nuclear Resonance Position on Chemical Compound. *Physical Review* **77**, 736 (1950).
12. Gutowsky, H.S. & McCall, D.W. Nuclear Magnetic Resonance Fine Structure in Liquids. *Physical Review* **82**, 748 (1951).
13. Hahn, E.L. & Maxwell, D.E. Chemical Shift and Field Independent Frequency Modulation of the Spin Echo Envelope. *Physical Review* **84**, 1246 (1951).
14. Ernst, R.R. & Anderson, W.A. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Review of Scientific Instruments* **37**, 93-102 (1966).
15. Aue, W.P., Bartholdi, E. & Ernst, R.R. 2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic-Resonance. *Journal of Chemical Physics* **64**, 2229-2246 (1976).
16. Braun, W., Wider, G., Lee, K.H. & Wüthrich, K. Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Biology* **169**, 921-948 (1983).



17. Kay, L., Clore, G., Bax, A. & Gronenborn, A. Four-dimensional heteronuclear triple-resonance NMR spectroscopy of interleukin-1 beta in solution. *Science* **249**, 411-414 (1990).
18. Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.beta. *Biochemistry* **28**, 6150-6156 (1989).
19. Torchia, D.A., Sparks, S.W. & Bax, A. NMR signal assignments of amide protons in the .alpha.-helical domains of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **27**, 5135-5141 (1988).
20. Andrew, E.R., Bradbury, A. & Eades, R.G. Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation. *Nature* **183**, 1802-1803 (1959).
21. Lowe, I.J. Free Induction Decays of Rotating Solids. *Physical Review Letters* **2**, 285 (1959).
22. Hartmann, S.R. & Hahn, E.L. Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.* **128**, 2042-2053 (1962).
23. Morris, G.A. & Freeman, R. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society* **101**, 760-762 (1979).
24. Samoson, A., Tuherm, T. & Gan, Z. High-field high-speed MAS resolution enhancement in H-1 NMR spectroscopy of solids. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **20**, 130-136 (2001).
25. Samoson, A., Tuherm, T., Past, J., Reinhold, A., Anupold, T. & Heinmaa, N. in *New Techniques in Solid-State Nmr*, Vol. 246 15-31 (Springer-Verlag Berlin, Berlin; 2005).
26. Martin, R.W. & Zilm, K.W. Preparation of protein nanocrystals and their characterization by solid state NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **165**, 162-174 (2003).
27. Castellani, F., van Rossum, B., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K. & Oschkinat, H. Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **420**, 98-102 (2002).
28. Jaroniec, C.P., MacPhee, C.E., Bajaj, V.S., McMahon, M.T., Dobson, C.M. & Griffin, R.G. High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 711-716 (2004).
29. Opella, S.J., Marassi, F.M., Gesell, J.J., Valente, A.P., Kim, Y., Oblatt-Montal, M. & Montal, M. Structures of the M2 channel-lining segments

- from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nature Structural Biology* **6**, 374-379 (1999).
30. Bertini, I., Bhaumik, A., De Paepe, G., Griffin, R.G., Lelli, M., Lewandowski, J.R. & Luchinat, C. High-Resolution Solid-State NMR Structure of a 17.6 kDa Protein. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 1032-1040 (2010).
  31. Gelis, I., Bonvin, A.M.J.J., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A. & Kalodimos, C.G. Structural Basis for Signal-Sequence Recognition by the Translocase Motor SecA as Determined by NMR. *Cell* **131**, 756-769 (2007).
  32. De Paepe, G., Lewandowski, J.R., Loquet, A., Bockmann, A. & Griffin, R.G. Proton assisted recoupling and protein structure determination. *Journal of Chemical Physics* **129** (2008).
  33. De Paëpe, G., Lewandowski, J.R., Loquet, A., Eddy, M.T., Megy, S., Böckmann, A. & Griffin, R.G. Heteronuclear Proton Assisted Recoupling. *submitted* (2010).
  34. Lewandowski, J.R., De Paepe, G. & Griffin, R.G. Proton assisted insensitive nuclei cross polarization. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 728-729 (2007).
  35. Weidel, W. & Pelzer, H. Bagshaped Macromolecules - a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **26**, 193-232 (1964).
  36. Vollmer, W., Blanot, D. & de Pedro, M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 149-167 (2008).
  37. Neuhaus, F.C. & Baddiley, J. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-Alanyl-Teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 686-+ (2003).
  38. Weidenmaier, C. & Peschel, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 276-287 (2008).
  39. Vollmer, W. & Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1714-1734 (2008).
  40. Hoskins, J. *et al.* Genome of the bacterium Streptococcus pneumoniae strain R6. *J Bacteriol* **183**, 5709-5717 (2001).
  41. Tettelin, H. *et al.* Complete genome sequence of a virulent isolate of Streptococcus pneumoniae. *Science* **293**, 498-506 (2001).
  42. Chaput, C. & Boneca, I.G. Peptidoglycan detection by mammals and flies. *Microbes Infect* **9**, 637-647 (2007).
  43. Matias, V.R.F. & Beveridge, T.J. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in Bacillus subtilis 168 and the existence of a periplasmic space. *Molecular Microbiology* **56**, 240-251 (2005).

44. Vollmer, W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 287-306 (2008).
45. Glauner, B., Holtje, J.V. & Schwarz, U. The Composition of the Murein of Escherichia-Coli. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 10088-10095 (1988).
46. Harz, H., Burgdorf, K. & Holtje, J.V. Isolation and Separation of the Glycan Strands from Murein of Escherichia-Coli by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal Biochem* **190**, 120-128 (1990).
47. Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K. & Foster, S.J. Cell wall peptidoglycan architecture in Bacillus subtilis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14603-14608 (2008).
48. Warth, A.D. & Stroming, J.I. Structure of Peptidoglycan from Vegetative Cell Walls of Bacillus-Subtilis. *Biochemistry* **10**, 4349-& (1971).
49. Boneca, I.G., Huang, Z.H., Gage, D.A. & Tomasz, A. Characterization of Staphylococcus aureus cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-acetylglucosaminidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9910-9918 (2000).
50. Atrih, A., Bacher, G., Allmaier, G., Williamson, M.P. & Foster, S.J. Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of Bacillus subtilis 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation. *Journal of Bacteriology* **181**, 3956-3966 (1999).
51. Healy, V.L., Lessard, I.A.D., Roper, D.I., Knox, J.R. & Walsh, C.T. Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry & Biology* **7**, R109-R119 (2000).
52. Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S. & Arthur, M. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 307-320 (2008).
53. Braun, V. & Rehn, K. Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of E Coli Cell Wall - Specific Effect of Trypsin on Membrane Structure. *European Journal of Biochemistry* **10**, 426-& (1969).
54. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A. & Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 234-258 (2008).
55. Schleifer, K.H. & Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477 (1972).
56. Wietzerb, J., Das, B.C., Petit, J.F., Lederer, E., Leyhbowi, M. & Ghuysen, J.M. Occurrence of D-Alanyl-(D)-Meso-Diaminopimelic Acid and Meso-Diaminopimelyl-Meso-Diaminopimelic Acid Interpeptide Linkages in Peptidoglycan of Mycobacteria. *Biochemistry* **13**, 3471-3476 (1974).
57. Mainardi, J.L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Brouard, J.P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L. & Arthur, M. A novel peptidoglycan

- cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 38146-38152 (2005).
58. Mainardi, J.L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J. & Gutmann, L. Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 16490-16496 (2000).
  59. de Jonge, B.L., Chang, Y.S., Gage, D. & Tomasz, A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *J Biol Chem* **267**, 11248-11254 (1992).
  60. Snowden, M.A. & Perkins, H.R. Peptidoglycan Cross-Linking in *Staphylococcus-Aureus* - an Apparent Random Polymerization Process. *European Journal of Biochemistry* **191**, 373-377 (1990).
  61. Formanek, H. & Formanek, S. Specific Staining for Electron Microscopy of Murein Sacculi of Bacterial Cell Walls. *European Journal of Biochemistry* **17**, 78-& (1970).
  62. De Petris, S. Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers. *J Ultrastruct Res* **19**, 45-83 (1967).
  63. Wientjes, F.B., Woldringh, C.L. & Nanninga, N. Amount of Peptidoglycan in Cell-Walls of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* **173**, 7684-7691 (1991).
  64. Matias, V.R.F., Al-Amoudi, A., Dubochet, J. & Beveridge, T.J. Cryo-transmission electron Microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6112-6118 (2003).
  65. Labischinski, H., Goodell, E.W., Goodell, A. & Hochberg, M.L. Direct Proof of a More-Than-Single-Layered Peptidoglycan Architecture of *Escherichia-Coli* W7 - a Neutron Small-Angle Scattering Study. *Journal of Bacteriology* **173**, 751-756 (1991).
  66. Yao, X., Jericho, M., Pink, D. & Beveridge, T. Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* **181**, 6865-6875 (1999).
  67. Barnickel, G., Labischinski, H., Bradaczek, H. & Giesbrecht, P. Conformational Energy Calculation on the Peptide Part of Murein. *European Journal of Biochemistry* **95**, 157-165 (1979).
  68. Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H. & Giesbrecht, P. On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium-angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. *Eur J Biochem* **95**, 147-155 (1979).
  69. Demchick, P. & Koch, A.L. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 768-773 (1996).

70. Vazquez-Laslop, N., Lee, H., Hu, R. & Neyfakh, A.A. Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 2399-2404 (2001).
71. Vollmer, W. & Seligman, S.J. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology* **18**, 59-66 (2010).
72. Carlstrom, D. The Crystal Structure of Alpha-Chitin (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamine). *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **3**, 669-683 (1957).
73. Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. & Langan, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose 1(alpha), from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 14300-14306 (2003).
74. Vollmer, W. & Holtje, J.V. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: Vertical scaffold or horizontal layer(s)? *Journal of Bacteriology* **186**, 5978-5987 (2004).
75. Gan, L., Chen, S.Y. & Jensen, G.J. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18953-18957 (2008).
76. Formanek, H., Formanek, S. & Wawra, H. 3-Dimensional Atomic Model of Murein Layer of Bacteria. *European Journal of Biochemistry* **46**, 279-294 (1974).
77. Formanek, H., Schleifer, K.H., Seidl, H.P., Lindemann, R. & Zundel, G. 3-Dimensional Structure of Peptidoglycan of Bacterial-Cell Walls - Infra-Red Investigations. *Febs Letters* **70**, 150-154 (1976).
78. Kelemen, M.V. & Rogers, H.J. 3-Dimensional Molecular Models of Bacterial Cell Wall Mucopolysaccharides (Peptidoglycans). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 992-& (1971).
79. Koch, A.L. Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**, 689-701 (1998).
80. Koch, A.L. Simulation of the conformation of the murein fabric: the oligoglycan, penta-muropeptide, and cross-linked nona-muropeptide. *Arch Microbiol* **174**, 429-439 (2000).
81. Pink, D., Moeller, J., Quinn, B., Jericho, M. & Beveridge, T. On the architecture of the gram-negative bacterial murein sacculus. *Journal of Bacteriology* **182**, 5925-5930 (2000).
82. Dmitriev, B.A., Toukach, F.V., Holst, O., Rietschel, E.T. & Ehlers, S. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *J Bacteriol* **186**, 7141-7148 (2004).
83. Dmitriev, B.A., Toukach, F.V., Schaper, K.M., Holst, O., Rietschel, E.T. & Ehlers, S. Tertiary structure of bacterial murein: The scaffold model. *Journal of Bacteriology* **185**, 3458-3468 (2003).

84. Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Hesek, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L. & Mobashery, S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4404-4409 (2006).
85. Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A.M., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A.J., Bertin, J., Sansonetti, P.J. & Philpott, D.J. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584-1587 (2003).
86. Guan, R. & Mariuzza, R.A. Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends in Microbiology* **15**, 127-134 (2007).
87. Fischer, W. Physiology of Lipoteichoic Acids in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **29**, 233-302 (1988).
88. Archibald, A.R., Baddiley, J. & Heckels, J.E. Molecular Arrangement of Teichoic Acid in Cell-Wall of *Staphylococcus-Lactis*. *Nature-New Biology* **241**, 29-31 (1973).
89. Birdsell, D.C., Doyle, R.J. & Morgenstern, M. Organization of Teichoic-Acid in Cell-Wall of *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **121**, 726-734 (1975).
90. Doyle, R.J., McDannel, M.L., Helman, J.R. & Streips, U.N. Distribution of Teichoic-Acid in Cell-Wall of *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **122**, 152-158 (1975).
91. Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kristian, S.A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J.J. & Peschel, A. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* **10**, 243-245 (2004).
92. Moscoso, M., Garcia, E. & Lopez, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of Bacteriology* **188**, 7785-7795 (2006).
93. Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V. & Neuhaus, F.C. Composition of Teichoic Acids from a Number of Bacterial Walls. *Nature* **184**, 247-248 (1959).
94. Araki, Y. & Ito, E. Linkage Units in Cell-Walls of Gram-Positive Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **17**, 121-135 (1989).
95. Coley, J., Tarelli, E., Archibald, A.R. & Baddiley, J. Linkage between Teichoic-Acid and Peptidoglycan in Bacterial-Cell Walls. *Febs Letters* **88**, 1-9 (1978).
96. Kojima, N., Araki, Y. & Ito, E. Structure of the Linkage Units between Ribitol Teichoic-Acids and Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* **161**, 299-306 (1985).
97. Baddiley, J. Structure, Biosynthesis, and Function of Teichoic Acids. *Accounts of Chemical Research* **3**, 98-& (1970).

98. Baddiley, J., Buchanan, J.G., Hardy, F.E., Rajbhand.Ul, Sanderson, A.R. & Martin, R.O. Structure of Ribitol Teichoic Acid of Staphylococcus Aureus H. *Biochimica Et Biophysica Acta* **52**, 406-& (1961).
99. Baddiley, J., Buchanan, J.G., Martin, R.O. & Rajbhand.Ul Teichoic Acid from Walls of Staphylococcus Aureus H .2. Location of Phosphate and Alanine Residues. *Biochemical Journal* **85**, 49-& (1962).
100. Baddiley, J., Buchanan, J.G., Sanderson, A.R. & Rajbhand.Ul Teichoic Acid from Walls of Staphylococcus Aureus H - Structure of N-Acetylglucosaminylribitol Residues. *Biochemical Journal* **82**, 439-& (1962).
101. Poxton, I.R., Tarelli, E. & Baddiley, J. Structure of C-Polysaccharide from Walls of Streptococcus-Pneumoniae. *Biochemical Journal* **175**, 1033-1042 (1978).
102. Neuhaus, F.C., Heaton, M.P., Debabov, D.V. & Zhang, Q.Y. The dlt operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in Lactobacillus casei. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* **2**, 77-84 (1996).
103. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. & Masure, H.R. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology* **25**, 819-829 (1997).
104. Rice, C.V. & Wickham, J.R. Heterogeneous binding of lipoteichoic acid to the surface of titanium dioxide as determined with (31)p solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 856-857 (2005).
105. Wickham, J.R. & Rice, C.V. Solid-state NMR studies of bacterial lipoteichoic acid adsorption on different surfaces. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **34**, 154-161 (2008).
106. Peschel, A. & Sahl, H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 529-536 (2006).
107. Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. & Gotz, F. Inactivation of the dlt operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8405-8410 (1999).
108. Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. & Gotz, F. The D-alanine residues of Staphylococcus aureus teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2845-2847 (2000).
109. Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* **10**, 179-186 (2002).
110. Peschel, A. & Collins, L.V. Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* **22**, 1651-1659 (2001).

111. Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Carss, B. & Greenberg, G.R. Isolation and Structure of Ribitol Phosphate Derivatives (Teichoic Acids) from Bacterial Cell Walls. *Journal of the Chemical Society*, 4344-4354 (1958).
112. Lambert, P.A., Hancock, I.C. & Baddiley, J. Interaction of Magnesium-Ions with Teichoic-Acid. *Biochemical Journal* **149**, 519-524 (1975).
113. Lambert, P.A., Hancock, I.C. & Baddiley, J. Influence of Alanyl Ester Residues on Binding of Magnesium-Ions to Teichoic-Acids. *Biochemical Journal* **151**, 671-676 (1975).
114. Halye, J.L. & Rice, C.V. Cadmium Chelation by Bacterial Teichoic Acid from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biomacromolecules* **11**, 333-340 (2010).
115. Wickham, J.R., Halye, J.L., Kashtanov, S., Khandogin, J. & Rice, C.V. Revisiting Magnesium Chelation by Teichoic Acid with Phosphorus Solid-State NMR and Theoretical Calculations. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 2177-2183 (2009).
116. Beveridge, T.J. & Murray, R.G.E. Sites of Metal-Deposition in the Cell-Wall of *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **141**, 876-887 (1980).
117. Matthews, T.H., Doyle, R.J. & Streips, U.N. Contribution of Peptidoglycan to the Binding of Metal-Ions by the Cell-Wall of *Bacillus-Subtilis*. *Current Microbiology* **3**, 51-53 (1979).
118. Patti, G.J., Kim, S.J. & Schaefer, J. Characterization of the peptidoglycan of vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium*. *Biochemistry* **47**, 8378-8385 (2008).
119. Tong, G., Pan, Y., Dong, H., Pryor, R., Wilson, G.E. & Schaefer, J. Structure and dynamics of pentaglycyl bridges in the cell walls of *Staphylococcus aureus* by C-13-N-15 REDOR NMR. *Biochemistry* **36**, 9859-9866 (1997).
120. Cegelski, L., Kim, S.J., Hing, A.W., Studelska, D.R., O'Connor, R.D., Mehta, A.K. & Schaefer, J. Rotational-echo double resonance characterization of the effects of vancomycin on cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **41**, 13053-13058 (2002).
121. Kim, S.J., Cegelski, L., Preobrazhenskaya, M. & Schaefer, J. Structures of *Staphylococcus aureus* cell-wall complexes with vancomycin, eremomycin, and chloroeremomycin derivatives by C-13{F-19} and N-15{F-19} rotational-echo double resonance. *Biochemistry* **45**, 5235-5250 (2006).
122. Kern, T., Hediger, S., Muller, P., Giustini, C., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W. & Simorre, J.P. Toward the characterization of peptidoglycan structure and protein - Peptidoglycan interactions by solid-state NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 5618-+ (2008).
123. Severin, A. & Tomasz, A. Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **178**, 168-174 (1996).



124. Lesage, A., Bardet, M. & Emsley, L. Through-bond carbon-carbon connectivities in disordered solids by NMR. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 10987-10993 (1999).
125. Chen, L.L., Olsen, R.A., Elliott, D.W., Boettcher, J.M., Zhou, D.H.H., Rienstra, C.M. & Mueller, L.J. Constant-time through-bond C-13 correlation spectroscopy for assigning protein resonances with solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 9992-9993 (2006).
126. Hediger, S., Meier, B.H. & Ernst, R.R. Adiabatic Passage Hartmann-Hahn Cross-Polarization in NMR under Magic-Angle Sample-Spinning. *Chemical Physics Letters* **240**, 449-456 (1995).
127. Fung, B.M., Khitrin, A.K. & Ermolaev, K. An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 97-101 (2000).
128. Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. Rapid Recording of 2d Nmr-Spectra without Phase Cycling - Application to the Study of Hydrogen-Exchange in Proteins. *Journal of Magnetic Resonance* **85**, 393-399 (1989).
129. Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V. & Griffin, R.G. Heteronuclear Decoupling in Rotating Solids. *Journal of Chemical Physics* **103**, 6951-6958 (1995).
130. Horne, D.S. & Tomasz, A. Possible Role of a Choline-Containing Teichoic Acid in the Maintenance of Normal-Cell Shape and Physiology in Streptococcus-Oralis. *Journal of Bacteriology* **175**, 1717-1722 (1993).
131. Kubler-Kielb, J., Coxon, B. & Schneerson, R. Chemical structure, conjugation, and cross-reactivity of Bacillus pumilus Sh18 cell wall polysaccharide. *Journal of Bacteriology* **186**, 6891-6901 (2004).
132. Klein, R.A., Hartmann, R., Egge, H., Behr, T. & Fischer, W. The aqueous solution structure of a lipoteichoic acid from Streptococcus pneumoniae strain R6 containing 2,4-diamino-2,4,6-trideoxy-galactose: Evidence for conformational mobility of the galactopyranose ring. *Carbohydrate Research* **281**, 79-98 (1996).
133. Batley, M., Redmond, J.W. & Wicken, A.J. Nuclear-Magnetic-Resonance Spectra of Lipoteichoic Acid. *Biochimica Et Biophysica Acta* **901**, 127-137 (1987).
134. Roberts, M.F., Jacobson, G.R., Scott, P.J., Mimura, C.S. & Stinson, M.W. P-31-Nmr Studies of the Oral Pathogen Streptococcus-Mutans - Observation of Lipoteichoic Acid. *Biochimica Et Biophysica Acta* **845**, 242-248 (1985).
135. Rose, R.K. & Hogg, S.D. Competitive-Binding of Calcium and Magnesium to Streptococcal Lipoteichoic Acid. *Bba-Gen Subjects* **1245**, 94-98 (1995).

136. Boudet, J., Duval, V., Van Melckebeke, H., Blackledge, M., Amoroso, A., Joris, B. & Simorre, J.P. Conformational and thermodynamic changes of the repressor/DNA operator complex upon monomerization shed new light on regulation mechanisms of bacterial resistance against beta-lactam antibiotics. *Nucleic Acids Res* **35**, 4384-4395 (2007).
137. Heptinst.S, Archibal.Ar & Baddiley, J. Teichoic Acids and Membrane Function in Bacteria. *Nature* **225**, 519-& (1970).
138. Hurst, A., Hughes, A., Duckworth, M. & Baddiley, J. Loss of D-Alanine during Sublethal Heating of Staphylococcus-Aureus-S6 and Magnesium Binding during Repair. *J Gen Microbiol* **89**, 277-284 (1975).
139. Schirner, K., Marles-Wright, J., Lewis, R.J. & Errington, J. Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in Bacillus subtilis. *Embo J* **28**, 830-842 (2009).
140. Formstone, A. & Errington, J. A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology* **55**, 1646-1657 (2005).
141. Kawai, Y., Daniel, R.A. & Errington, J. Regulation of cell wall morphogenesis in Bacillus subtilis by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Molecular Microbiology* **71**, 1131-1144 (2009).
142. Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Lyklema, J. & Zehnder, A.J.B. The Isoelectric Point of Bacteria as an Indicator for the Presence of Cell-Surface Polymers That Inhibit Adhesion. *Colloid Surface B* **4**, 191-197 (1995).
143. Site web de l'Organisation Mondiale de la Santé. <http://who.int>.
144. Jedrzejask, M.J. Pneumococcal virulence factors: Structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 187-+ (2001).
145. O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T. & Dis, H.P.G.B. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**, 893-902 (2009).
146. Baquero, F., Martinez-Beltran, J. & Loza, E. A review of antibiotic resistance patterns of Streptococcus pneumoniae in Europe. *J Antimicrob Chemother* **28 Suppl C**, 31-38 (1991).
147. Linares, J., Ardanuy, C., Pallares, R. & Fenoll, A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-year period. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 402-410 (2010).
148. Novak, R., Henriques, B., Charpentier, E., Normark, S. & Tuomanen, E. Emergence of vancomycin tolerance in Streptococcus pneumoniae. *Nature* **399**, 590-593 (1999).
149. Butler, J.C., Shapiro, E.D. & Carlone, G.M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am J Med* **107**, 69S-76S (1999).
150. Schranz, J. Pneumococcal conjugate vaccines: what do we know and what do we need? *2nd Global Congress on Vaccines* **1**, 189-205, 209 (2009).

151. Tai, S.S. Streptococcus pneumoniae protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol* **32**, 139-153 (2006).
152. Fernandez-Tornero, C., Lopez, R., Garcia, E., Gimenez-Gallego, G. & Romero, A. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nature Structural Biology* **8**, 1020-1024 (2001).
153. Vollmer, W. & Tomasz, A. Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology* **39**, 1610-1622 (2001).
154. Holtje, J.V. & Tomasz, A. Teichoic-Acid Phosphorylcholine Esterase - Novel Enzyme-Activity in Pneumococcus. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 7032-7034 (1974).
155. Garau, G., Lemaire, D., Vernet, T., Dideberg, O. & Di Guilmi, A.M. Crystal structure of phosphorylcholine esterase domain of the virulence factor choline-binding protein E from Streptococcus pneumoniae - New structural features among the metallo-beta-lactamase superfamily. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 28591-28600 (2005).
156. Hermoso, J.A., Lagartera, L., Gonzalez, A., Stelter, M., Garcia, P., Martinez-Ripoll, M., Garcia, J.L. & Menendez, M. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 533-538 (2005).
157. Lagartera, L., Gonzalez, A., Stelter, M., Garcia, P., Kahn, R., Menendez, M. & Hermoso, J.A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **61**, 221-224 (2005).
158. Les coordonnées atomiques proviennent de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>), code d'accès 2BIB.
159. Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. & Masure, H.R. Role of novel choline binding proteins in virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infection and Immunity* **68**, 5690-5695 (2000).
160. Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T. & Di Guilmi, A.M. Streptococcus pneumoniae choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infection and Immunity* **76**, 466-476 (2008).
161. Bjerring, M. & Nielsen, N.C. Solid-state NMR heteronuclear dipolar recoupling using off-resonance symmetry-based pulse sequences. *Chemical Physics Letters* **370**, 496-503 (2003).
162. Schaefer, J., McKay, R.A. & Stejskal, E.O. Double-Cross-Polarization Nmr of Solids. *Journal of Magnetic Resonance* **34**, 443-447 (1979).

163. Sun, B.Q., Costa, P.R., Kocisko, D., Lansbury, P.T. & Griffin, R.G. Inter-nuclear Distance Measurements in Solid-State Nuclear-Magnetic-Resonance - Dipolar Recoupling Via Rotor Synchronized Spin Locking. *Journal of Chemical Physics* **102**, 702-707 (1995).
164. Wu, X.L. & Zilm, K.W. Cross-Polarization with High-Speed Magic-Angle-Spinning. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **104**, 154-165 (1993).
165. Hing, A.W., Vega, S. & Schaefer, J. Transferred-Echo Double-Resonance NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **96**, 205-209 (1992).
166. Jaroniec, C.P., Filip, C. & Griffin, R.G. 3D TEDOR NMR experiments for the simultaneous measurement of multiple carbon-nitrogen distances in uniformly C-13, N-15-labeled solids. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 10728-10742 (2002).
167. Jaroniec, C.P., Tounge, B.A., Herzfeld, J. & Griffin, R.G. Frequency selective heteronuclear dipolar recoupling in rotating solids: Accurate C-13-N-15 distance measurements in uniformly C-13,N-15-labeled peptides. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 3507-3519 (2001).
168. Jaroniec, C.P., Tounge, B.A., Rienstra, C.M., Herzfeld, J. & Griffin, R.G. Measurement of C-13-N-15 distances in uniformly C-13 labeled biomolecules: J-decoupled REDOR. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 10237-10238 (1999).
169. Saalwachter, K., Graf, R. & Spiess, H.W. Recoupled polarization-transfer methods for solid-state H-1-C-13 heteronuclear correlation in the limit of fast MAS. *Journal of Magnetic Resonance* **148**, 398-418 (2001).
170. Lange, A., Luca, S. & Baldus, M. Structural constraints from proton-mediated rare-spin correlation spectroscopy in rotating solids. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 9704-9705 (2002).
171. Gardiennet, C., Loquet, A., Bockmann, A., Etzkorn, M., Heise, H. & Baldus, M. Structural constraints for the Crh protein from solid-state NMR experiments. *Journal of Biomolecular Nmr* **40**, 239-250 (2008).
172. Loquet, A., Bardiaux, B., Gardiennet, C., Blanchet, C., Baldus, M., Nilges, M., Malliavin, T. & Bockmann, A. 3D structure determination of the Crh protein from highly ambiguous solid-state NMR restraints. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 3579-3589 (2008).
173. Jehle, S., Falb, M., Kirkpatrick, J.P., Oschkinat, H., van Rossum, B.J., Althoff, G. & Carlomagno, T. Intermolecular Protein-RNA Interactions Revealed by 2D P-31-N-15 Magic Angle Spinning Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 3842-3846 (2010).
174. Veshtort, M. & Griffin, R.G. SPINEVOLUTION: a powerful tool for the simulation of solid and liquid state NMR experiments. *J. Magn. Reson.* **178**, 248-282 (2006).

175. Ye, C.H., Fu, R.Q., Hu, J.Z., Hou, L. & Ding, S.W. C-13 Chemical-Shift Anisotropies of Solid Amino-Acids. *Magnetic Resonance in Chemistry* **31**, 699-704 (1993).
176. Protein data bank. <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.
177. Fourier, J. Théorie analytique de la chaleur. (Firmin Didot Père et Fils, Paris; 1822).
178. Schanda, P. Fast-pulsing longitudinal relaxation optimized techniques: Enriching the toolbox of fast biomolecular NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55**, 238-265 (2009).
179. Nyquist, H. Certain topics in telegraph transmission theory. *Proceedings of the IEEE* **90**, 280-305 (2002).
180. Shannon, C.E. Communication In The Presence Of Noise. *Proceedings of the IEEE* **86**, 447-457 (1998).
181. Schanda, P., Vol. PhD thesis (Université Joseph Fourier, Grenoble; 2007).
182. Ross, A., Salzmann, M. & Senn, H. Fast-HMQC using Ernst angle pulses: An efficient tool for screening of ligand binding to target proteins. *Journal of Biomolecular Nmr* **10**, 389-396 (1997).
183. Schanda, P. & Brutscher, B. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 8014-8015 (2005).
184. Chen, J.H., De Angelis, A.A., Mandelshtam, V.A. & Shaka, A.J. Progress on the two-dimensional filter diagonalization method. An efficient doubling scheme for two-dimensional constant-time NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **162**, 74-89 (2003).
185. Mandelshtam, V.A. FDM: the filter diagonalization method for data processing in NMR experiments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **38**, 159-196 (2001).
186. Pons, J.L., Malliavin, T.E. & Delsuc, M.A. Gifa V 4: A complete package for NMR data set processing. *Journal of Biomolecular Nmr* **8**, 445-452 (1996).
187. Orekhov, V.Y., Ibraghimov, I. & Billeter, M. Optimizing resolution in multidimensional NMR by three-way decomposition. *Journal of Biomolecular Nmr* **27**, 165-173 (2003).
188. Jaravine, V., Ibraghimov, I. & Orekhov, V.Y. Removal of a time barrier for high-resolution multidimensional NMR spectroscopy. *Nature Methods* **3**, 605-607 (2006).
189. Jaravine, V.A., Zhuravleva, A.V., Permi, P., Ibraghimov, I. & Orekhov, V.Y. Hyperdimensional NMR spectroscopy with nonlinear sampling. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 3927-3936 (2008).
190. Marion, D. Fast acquisition of NMR spectra using Fourier transform of non-equispaced data. *J Biomol NMR* **32**, 141-150 (2005).

191. Kazimierczuk, K., Kozminski, W. & Zhukov, I. Two-dimensional Fourier transform of arbitrarily sampled NMR data sets. *Journal of Magnetic Resonance* **179**, 323-328 (2006).
192. Pannetier, N., Houben, K., Blanchard, L. & Marion, D. Optimized 3D-NMR sampling for resonance assignment of partially unfolded proteins. *Journal of Magnetic Resonance* **186**, 142-149 (2007).
193. Bruschweiler, R. & Zhang, F.L. Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **120**, 5253-5260 (2004).
194. Hu, B., Amoureux, J.P., Trebosc, J., Deschamps, M. & Tricot, G. Solid-state NMR covariance of homonuclear correlation spectra. *Journal of Chemical Physics* **128**, - (2008).
195. Kaiser, C., Lopez, J.J., Bermel, W. & Glaubitz, C. Dual transformation of homonuclear solid-state NMR spectra--an option to decrease measuring time. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 3107-3115 (2007).
196. Jeannerat, D. Computer optimized spectral aliasing in the indirect dimension of H-1-C-13 heteronuclear 2D NMR experiments. A new algorithm and examples of applications to small molecules. *Journal of Magnetic Resonance* **186**, 112-122 (2007).
197. Lescop, E., Schanda, P., Rasia, R. & Brutscher, B. Automated spectral compression for fast multidimensional NMR and increased time resolution in real-time NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 2756-+ (2007).
198. Brutscher, B., Simorre, J.P., Caffrey, M.S. & Marion, D. Design of a Complete Set of 2-Dimensional Triple-Resonance Experiments for Assigning Labeled Proteins. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **105**, 77-82 (1994).
199. Szyperski, T., Wider, G., Bushweller, J.H. & Wuthrich, K. Reduced dimensionality in triple-resonance NMR experiments. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 9307-9308 (1993).
200. Kim, S. & Szyperski, T. GFT NMR, a new approach to rapidly obtain precise high-dimensional NMR spectral information. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1385-1393 (2003).
201. Brutscher, B., Morelle, N., Cordier, F. & Marion, D. Determination of an initial set of nOe-derived distance constraints for the structure determination of N-15/C-13-labeled proteins. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **109**, 238-242 (1995).
202. Atreya, H.S. & Szyperski, T. in *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules, Part C, Vol. 394* 78-108 (Elsevier Academic Press Inc, San Diego; 2005).
203. Freeman, R. & Kupce, E. Distant echoes of the accordion: Reduced dimensionality, GFT-NMR, and projection-reconstruction of multidimensional spectra. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **23A**, 63-75 (2004).

204. Szyperski, T. & Atreya, H.S. Principles and applications of GFT projection NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**, S51-S60 (2006).
205. Kupce, E. & Freeman, R. Projection-reconstruction of three-dimensional NMR spectra. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 13958-13959 (2003).
206. Kupce, E. & Freeman, R. Projection-reconstruction technique for speeding up multidimensional NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6429-6440 (2004).
207. Kupce, E. & Freeman, R. The Radon transform: A new scheme for fast multidimensional NMR. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **22A**, 4-11 (2004).
208. Astrof, N.S., Lyon, C.E. & Griffin, R.G. Triple Resonance Solid State NMR Experiments with Reduced Dimensionality Evolution Periods. *Journal of Magnetic Resonance* **152**, 303-307 (2001).
209. Bertelsen, K., Pedersen, J.M., Nielsen, N.C. & Vosegaard, T. 2D separated-local-field spectra from projections of 1D experiments. *Journal of Magnetic Resonance* **184**, 330-336 (2007).
210. Vosegaard, T. & Massiot, D. High-resolution two-dimensional NMR spectra of half-integer-spin quadrupolar nuclei from one-dimensional projections. *Chemical Physics Letters* **437**, 120-125 (2007).
211. Kupce, E. & Freeman, R. Fast multi-dimensional Hadamard spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **163**, 56-63 (2003).
212. Kupce, E. & Freeman, R. Frequency-domain Hadamard spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **162**, 158-165 (2003).
213. Kupce, E. & Freeman, R. Two-dimensional Hadamard spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **162**, 300-310 (2003).
214. Ashida, J., Kupce, E. & Amoureux, J.P. Hadamard NMR spectroscopy in solids. *Journal of Magnetic Resonance* **178**, 129-135 (2006).
215. Frydman, L. Single-scan multidimensional NMR. *Comptes Rendus Chimie* **9**, 336-345 (2006).
216. Frydman, L., Lupulescu, A. & Scherf, T. Principles and features of single-scan two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 9204-9217 (2003).
217. Frydman, L., Scherf, T. & Lupulescu, A. The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15858-15862 (2002).
218. Mishkovsky, M., Kupce, E. & Frydman, L. Ultrafast-based projection-reconstruction three-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **127**, - (2007).
219. Shrot, Y. & Frydman, L. Single-scan NMR spectroscopy at arbitrary dimensions. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 11385-11396 (2003).

220. Gal, M., Mishkovsky, M. & Frydman, L. Real-time monitoring of chemical transformations by ultrafast 2D NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 951-956 (2006).
221. Shapira, B., Karton, A., Aronzon, D. & Frydman, L. Real-time 2D NMR identification of analytes undergoing continuous chromatographic separation. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 1262-1265 (2004).
222. Frydman, L. & Blazina, D. Ultrafast two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized solutions. *Nature Physics* **3**, 415-419 (2007).
223. Shapira, B., Morris, E., Muszkat, K.A. & Frydman, L. Sub-second 2D NMR spectroscopy at sub-millimolar concentrations. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 11756-11757 (2004).
224. Gal, M., Melian, C., Demco, D.E., Blumich, B. & Frydman, L. Solid-state single-scan 2D NMR under magic-angle-spinning. *Chemical Physics Letters* **459**, 188-193 (2008).
225. Ernst, R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. Principles of Nuclear Magnetic Resonances in One and Two Dimensions. (1987).
226. Pervushin, K., Vogeli, B. & Eletsky, A. Longitudinal H-1 relaxation optimization in TROSY NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 12898-12902 (2002).
227. Grzesiek, S. & Bax, A. The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 12593-12594 (1993).
228. Schanda, P., Van Melckebeke, H. & Brutscher, B. Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 9042-9043 (2006).
229. Schanda, P., Kupce, E. & Brutscher, B. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *Journal of Biomolecular Nmr* **33**, 199-211 (2005).
230. Schanda, P., Lescop, E., Falge, M., Sounier, R., Boisbouvier, J. & Brutscher, B. Sensitivity-optimized experiment for the measurement of residual dipolar couplings between amide protons. *Journal of Biomolecular Nmr* **38**, 47-55 (2007).
231. Lescop, E. & Brutscher, B. Highly automated protein backbone resonance assignment within a few hours: the ((BATCH)) strategy and software package. *Journal of Biomolecular Nmr* **44**, 43-57 (2009).
232. Lescop, E., Schanda, P. & Brutscher, B. A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *Journal of Magnetic Resonance* **187**, 163-169 (2007).
233. Schanda, P., Forge, V. & Brutscher, B. HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**, S177-S184 (2006).



234. Schanda, P., Forge, V. & Brutscher, B. Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11257-11262 (2007).
235. Arnerio, C., Schanda, P., Dura, M.A., Ayala, I., Marion, D., Franzetti, B., Brutscher, B. & Boisbouvier, J. Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy of High Molecular Weight Protein Assemblies. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 3448-+ (2009).
236. Farjon, J., Boisbouvier, J., Schanda, P., Pardi, A., Simorre, J.P. & Brutscher, B. Longitudinal-Relaxation-Enhanced NMR Experiments for the Study of Nucleic Acids in Solution. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 8571-8577 (2009).
237. Ernst, M., Samoson, A. & Meier, B.H. Low-power decoupling in fast magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters* **348**, 293-302 (2001).
238. Ernst, M. Heteronuclear spin decoupling in solid-state NMR under magic-angle sample spinning. *Journal of Magnetic Resonance* **162**, 1-34 (2003).
239. Ernst, M., Samoson, A. & Meier, B.H. Low-power XiX decoupling in MAS NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance* **163**, 332-339 (2003).
240. Kotecha, M., Wickramasinghe, N.P. & Ishii, Y. Efficient low-power heteronuclear decoupling in  $(^{13}\text{C})$  high-resolution solid-state NMR under fast magic angle spinning. *Magn Reson Chem* **45**, S221-S230 (2007).
241. Laage, S., Marchetti, A., Sein, J., Pierattelli, R., Sass, H.J., Grzesiek, S., Lesage, A., Pintacuda, G. & Emsley, L. Band-Selective H-1-C-13 Cross-Polarization in Fast Magic Angle Spinning Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 17216-+ (2008).
242. Lange, A., Scholz, I., Manolikas, T., Ernst, M. & Meier, B.H. Low-power cross polarization in fast magic-angle spinning NMR experiments. *Chemical Physics Letters* **468**, 100-105 (2009).
243. Demers, J.P., Vijayan, V., Becker, S. & Lange, A. Tailored low-power cross-polarization under fast magic-angle spinning. *Journal of Magnetic Resonance* **205**, 216-223 (2010).
244. Ernst, M., Meier, M.A., Tüherm, T., Samoson, A. & Meier, B.H. Low-power high-resolution solid-state NMR of peptides and proteins. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 4764-4765 (2004).
245. Vijayan, V., Demers, J.P., Biernat, J., Mandelkow, E., Becker, S. & Lange, A. Low-Power Solid-State NMR Experiments for Resonance Assignment under Fast Magic-Angle Spinning. *ChemPhysChem* **10**, 2205-2208 (2009).
246. Laage, S., Sachleben, J.R., Steuernagel, S., Pierattelli, R., Pintacuda, G. & Emsley, L. Fast acquisition of multi-dimensional spectra in solid-state NMR enabled by ultra-fast MAS. *Journal of Magnetic Resonance* **196**, 133-141 (2009).

247. Ganapathy, S., Naito, A. & McDowell, C.A. Paramagnetic doping as an aid in obtaining high-resolution C-13 NMR-spectra of biomolecules in the Solid-State. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 6011-6015 (1981).
248. Long, H.W. & Tycko, R. Biopolymer conformational distributions from solid-state NMR: alpha-helix and 3(10)-helix contents of a helical peptide. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 7039-7048 (1998).
249. Wickramasinghe, N.P., Kotecha, M., Samoson, A., Past, J. & Ishii, Y. Sensitivity enhancement in C-13 solid-state NMR of protein microcrystals by use of paramagnetic metal ions for optimizing H-1 T-1 relaxation. *Journal of Magnetic Resonance* **184**, 350-356 (2007).
250. Wickramasinghe, N.P., Parthasarathy, S., Jones, C.R., Bhardwaj, C., Long, F., Kotecha, M., Mehboob, S., Fung, L.W.M., Past, J., Samoson, A. & Ishii, Y. Nanomole-scale protein solid-state NMR by breaking intrinsic H-1 T-1 boundaries. *Nature Methods* **6**, 215-218 (2009).
251. Linser, R., Chevelkov, V., Diehl, A. & Reif, B. Sensitivity enhancement using paramagnetic relaxation in MAS solid-state NMR of perdeuterated proteins. *Journal of Magnetic Resonance* **189**, 209-216 (2007).
252. Yamamoto, K., Xu, J., Kawulka, K.E., Vederas, J.C. & Ramamoorthy, A. Use of a Copper-Chelated Lipid Speeds Up NMR Measurements from Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 6929-6931 (2010).
253. Lopez, J.J., Kaiser, C., Asami, S. & Glaubitz, C. Higher Sensitivity through Selective C-13 Excitation in Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 15970-+ (2009).
254. Katoh, E., Takegoshi, K. & Terao, T. C-13 nuclear overhauser polarization-magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy in uniformly C-13-labeled solid proteins. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 3653-3657 (2004).
255. Takegoshi, K. & Terao, T. C-13 nuclear Overhauser polarization nuclear magnetic resonance in rotating solids: Replacement of cross polarization in uniformly C-13 labeled molecules with methyl groups. *Journal of Chemical Physics* **117**, 1700-1707 (2002).
256. Metz, G., Wu, X.L. & Smith, S.O. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **110**, 219-227 (1994).
257. Kimura, H., Nakamura, K., Eguchi, A., Sugisawa, H., Deguchi, K., Ebisawa, K., Suzuki, E. & Shoji, A. Structural study of alpha-amino-acid crystals by H-1 CRAMPS NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **447**, 247-255 (1998).
258. Henry, B., Tekely, P. & Delpuech, J.J. pH and pK determinations by high-resolution solid-state C-13 NMR: Acid-base and tautomeric equilibria of ly-

- ophilized L-histidine. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 2025-2034 (2002).
259. Torchia, D.A. Measurement of Proton-Enhanced C-13 T1 Values by a Method Which Suppresses Artifacts. *Journal of Magnetic Resonance* **30**, 613-616 (1978).
  260. Vanderhart, D.L. Natural-Abundance C-13-C-13 Spin Exchange in Rigid Crystalline Organic-Solids. *Journal of Magnetic Resonance* **72**, 13-47 (1987).
  261. Jansson, M., Li, Y.C., Jendeberg, L., Anderson, S., Montelione, B.T. & Nilsson, B. High-level production of uniformly <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-enriched fusion proteins in Escherichia coli. *J Biomol NMR* **7**, 131-141 (1996).
  262. Serre, L., Rossy, E., Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C. & Coves, J. Crystal structure of the oxidized form of the periplasmic mercury-binding protein MerP from Ralstonia metallidurans CH34. *Journal of Molecular Biology* **339**, 161-171 (2004).
  263. Boudet, J., Chouquet, A., Chahboune, A., Giustini, C., Joris, B., Simorre, J.P. & Bougault, C. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of YajG, an Escherichia coli protein of unknown structure and function. *Biomol NMR Assign* **1**, 89-91 (2007).
  264. Giraud, N., Sein, J., Pintacuda, G., Bockmann, A., Lesage, A., Blackledge, M. & Emsley, L. Observation of heteronuclear overhauser effects confirms the N-15-H-1 dipolar relaxation mechanism in a crystalline protein. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 12398-12399 (2006).
  265. Scholz, I., Huber, M., Manolikas, T., Meier, B.H. & Ernst, M. MIRROR recoupling and its application to spin diffusion under fast magic-angle spinning. *Chemical Physics Letters* **460**, 278-283 (2008).
  266. Lewandowski, J.R., Sein, J., Sass, H.J., Grzesiek, S., Blackledge, M. & Emsley, L. Measurement of Site-Specific C-13 Spin-Lattice Relaxation in a Crystalline Protein. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 8252-+ (2010).
  267. Morcombe, C.R., Gaponenko, V., Byrd, R.A. & Zilm, K.W. Diluting abundant spins by isotope edited radio frequency field assisted diffusion. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 7196-7197 (2004).
  268. Takegoshi, K., Nakamura, S. & Terao, T. C-13-H-1 dipolar-driven C-13-C-13 recoupling without C-13 rf irradiation in nuclear magnetic resonance of rotating solids. *Journal of Chemical Physics* **118**, 2325-2341 (2003).
  269. De Paepe, G., Lewandowski, J.R. & Griffin, R.G. Spin dynamics in the modulation frame: Application to homonuclear recoupling in magic angle spinning solid-state NMR. *Journal of Chemical Physics* **128**, - (2008).
  270. Balayssac, S.p., Bertini, I., Bhaumik, A., Lelli, M. & Luchinat, C. Paramagnetic shifts in solid-state NMR of proteins to elicit structural informa-

- tion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17284-17289 (2008).
271. Franks, W.T., Wylie, B.J., Schmidt, H.L.F., Nieuwkoop, A.J., Mayrhofer, R.M., Shah, G.J., Graesser, D.T. & Rienstra, C.M. Dipole tensor-based atomic-resolution structure determination of a nanocrystalline protein by solid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4621-4626 (2008).
  272. Lange, A., Becker, S., Seidel, K., Giller, K., Pongs, O. & Baldus, M. A concept for rapid protein-structure determination by solid-state NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 2089-2092 (2005).
  273. Manolikas, T., Herrmann, T. & Meier, B.H. Protein structure determination from C-13 spin-diffusion solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 3959-3966 (2008).
  274. Nieuwkoop, A.J., Wylie, B.J., Franks, W.T., Shah, G.J. & Rienstra, C.M. Atomic resolution protein structure determination by three-dimensional transferred echo double resonance solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **131**, - (2009).
  275. Robustelli, P., Cavalli, A. & Vendruscolo, M. Determination of Protein Structures in the Solid State from NMR Chemical Shifts. *Structure* **16**, 1764-1769 (2008).
  276. Zech, S.G., Wand, A.J. & McDermott, A.E. Protein structure determination by high-resolution solid-state NMR spectroscopy: Application to microcrystalline ubiquitin. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 8618-8626 (2005).
  277. Zhang, Y., Doherty, T., Li, J., Lu, W., Barinka, C., Lubkowski, J. & Hong, M. Resonance Assignment and Three-Dimensional Structure Determination of a Human [alpha]-Defensin, HNP-1, by Solid-State NMR. *Journal of Molecular Biology* **397**, 408-422 (2010).
  278. Zhou, D.H., Shea, J.J., Nieuwkoop, A.J., Franks, W.T., Wylie, B.J., Mullen, C., Sandoz, D. & Rienstra, C.M. Solid-state protein-structure determination with proton-detected triple-resonance 3D magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**, 8380-8383 (2007).
  279. Cady, S.D., Mishanina, T.V. & Hong, M. Structure of Amantadine-Bound M2 Transmembrane Peptide of Influenza A in Lipid Bilayers from Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR: The Role of Ser31 in Amantadine Binding. *Journal of Molecular Biology* **385**, 1127-1141 (2009).
  280. Cady, S.D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., Soto, C.S., DeGrado, W.F. & Hong, M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature* **463**, 689-692 (2010).
  281. De Angelis, A.A., Howell, S.C., Nevzorov, A.A. & Opella, S.J. Structure Determination of a Membrane Protein with Two Trans-membrane Helices

- in Aligned Phospholipid Bicelles by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 12256-12267 (2006).
282. Hu, J., Asbury, T., Achuthan, S., Li, C., Bertram, R., Quine, J.R., Fu, R. & Cross, T.A. Backbone Structure of the Amantadine-Blocked Trans-Membrane Domain M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *Biophysical Journal* **92**, 4335-4343 (2007).
  283. Ketchum, R., Hu, W. & Cross, T. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science* **261**, 1457-1460 (1993).
  284. Mani, R., Tang, M., Wu, X., Buffy, J.J., Waring, A.J., Sherman, M.A. & Hong, M. Membrane-Bound Dimer Structure of a  $\beta$ -Hairpin Antimicrobial Peptide from Rotational-Echo Double-Resonance Solid-State NMR *Biochemistry* **45**, 8341-8349 (2006).
  285. Marassi, F.M. & Opella, S.J., Vol. 12 403-411 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003).
  286. Park, S.H., Mrse, A.A., Nevzorov, A.A., Mesleh, M.F., Oblatt-Montal, M., Montal, M. & Opella, S.J. Three-dimensional Structure of the Channel-forming Trans-membrane Domain of Virus Protein "u" (Vpu) from HIV-1. *Journal of Molecular Biology* **333**, 409-424 (2003).
  287. Traaseth, N.J., Shi, L., Verardi, R., Mullen, D.G., Barany, G. & Veglia, G. Structure and topology of monomeric phospholamban in lipid membranes determined by a hybrid solution and solid-state NMR approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 10165-10170 (2009).
  288. Valentine, K.G., Liu, S.F., Marassi, F.M., Veglia, G., Opella, S.J., Ding, F.X., Wang, S.H., Arshava, B., Becker, J.M. & Naider, F., Vol. 59 243-256 (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
  289. Wang, J.F., Kim, S., Kovacs, F. & Cross, T.A. Structure of the transmembrane region of the M2 protein H<sup>+</sup> channel. *Protein Science* **10**, 2241-2250 (2001).
  290. Ferguson, N., Becker, J., Tidow, H., Tremmel, S., Sharpe, T.D., Krause, G., Flinders, J., Petrovich, M., Berriman, J., Oschkinat, H. & Fersht, A.R. General structural motifs of amyloid protofilaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16248-16253 (2006).
  291. Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H. & Goto, Y. 3D structure of amyloid protofilaments of beta(2)-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18119-18124 (2006).
  292. Nielsen, J., Bjerring, M., Jeppesen, M., Pedersen, R., Pedersen, J., Hein, K., Vosegaard, T., Skrydstrup, T., Otzen, D. & Nielsen, N., Vol. 48 2118-2121 (WILEY-VCH Verlag, 2009).

293. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A.B., Riek, R. & Meier, B.H. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta sole-noid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523-1526 (2008).
294. Hologne, M., Chevelkov, V. & Reif, B. Deuterated peptides and proteins in MAS solid-state NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectros-copy* **48**, 211-232 (2006).
295. Salager, E., Stein, R.S., Steuernagel, S., Lesage, A., Elena, B. & Emsley, L. Enhanced sensitivity in high-resolution H-1 solid-state NMR spectroscopy with DUMBO dipolar decoupling under ultra-fast MAS. *Chemical Physics Letters* **469**, 336-341 (2009).
296. Zhou, D.H., Shah, G., Cormos, M., Mullen, C., Sandoz, D. & Rienstra, C.M. Proton-detected solid-state NMR Spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz magic-angle spinning. *Journal of the American Chemi-cal Society* **129**, 11791-11801 (2007).
297. Hodgkinson, P. & Emsley, L. The accuracy of distance measurements in solid-state NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **139**, 46-59 (1999).
298. Bayro, M.J., Huber, M., Ramachandran, R., Davenport, T.C., Meier, B.H., Ernst, M. & Griffin, R.G. Dipolar truncation in magic-angle spinning NMR recoupling experiments. *Journal of Chemical Physics* **130**, 8 (2009).
299. Ladizhansky, V. Homonuclear dipolar recoupling techniques for structure determination in uniformly <sup>13</sup>C-labeled proteins. *Solid State Nuclear Mag-netic Resonance* **36**, 119-128 (2009).
300. Bennett, A.E., Ok, J.H., Griffin, R.G. & Vega, S. Chemical-Shift Correla-tion Spectroscopy in Rotating Solids - Radio Frequency-Driven Dipolar Re-coupling and Longitudinal Exchange. *Journal of Chemical Physics* **96**, 8624-8627 (1992).
301. Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Griffiths, J.M., Zhen, W.G., Lansbury, P.T. & Griffin, R.G. Homonuclear radio frequency-driven recoupling in rotating solids. *Journal of Chemical Physics* **108**, 9463-9479 (1998).
302. Nielsen, N.C., Bildsoe, H., Jakobsen, H.J. & Levitt, M.H. Double-Quantum Homonuclear Rotary Resonance - Efficient Dipolar Recovery in Magic-Angle-Spinning Nuclear-Magnetic-Resonance. *Journal of Chemical Physics* **101**, 1805-1812 (1994).
303. Hohwy, M., Jakobsen, H.J., Eden, M., Levitt, M.H. & Nielsen, N.C. Broad-band dipolar recoupling in the nuclear magnetic resonance of rotating sol-ids: A compensated C7 pulse sequence. *Journal of Chemical Physics* **108**, 2686-2694 (1998).
304. Hohwy, M., Rienstra, C.M., Jaroniec, C.P. & Griffin, R.G. Fivefold sym-metric homonuclear dipolar recoupling in rotating solids: Application to double quantum spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **110**, 7983-7992 (1999).

305. Andrew, E.R., Clough, S., Farnell, L.F., Gledhill, T.D. & Roberts, I. Resonant Rotational Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Physics Letters* **21**, 505 (1966).
306. Raleigh, D.P., Creuzet, F., Gupta, S.K.D., Levitt, M.H. & Griffin, R.G. Measurement of Internuclear Distances in Polycrystalline Solids - Rotationally Enhanced Transfer of Nuclear-Spin Magnetization. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 4502-4503 (1989).
307. Raleigh, D.P., Levitt, M.H. & Griffin, R.G. Rotational Resonance in Solid-State Nmr. *Chemical Physics Letters* **146**, 71-76 (1988).
308. Costa, P.R., Sun, B.Q. & Griffin, R.G. Rotational resonance tickling: Accurate internuclear distance measurement in solids. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 10821-10830 (1997).
309. Costa, P.R., Sun, B.Q. & Griffin, R.G. Rotational resonance NMR: separation of dipolar coupling and zero quantum relaxation. *Journal of Magnetic Resonance* **164**, 92-103 (2003).
310. Takegoshi, K., Nomura, K. & Terao, T. Rotational Resonance in the Tilted Rotating-Frame. *Chemical Physics Letters* **232**, 424-428 (1995).
311. Takegoshi, K., Nomura, K. & Terao, T. Selective homonuclear polarization transfer in the tilted rotating frame under magic angle spinning in solids. *Journal of Magnetic Resonance* **127**, 206-216 (1997).
312. Szeverenyi, N.M., Sullivan, M.J. & Maciel, G.E. Observation of Spin Exchange by Two-Dimensional Fourier-Transform C-13 Cross Polarization-Magic-Angle Spinning. *Journal of Magnetic Resonance* **47**, 462-475 (1982).
313. Takegoshi, K., Nakamura, S. & Terao, T. C-13-H-1 dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters* **344**, 631-637 (2001).
314. Weingarth, M., Bodenhausen, G. & Tekely, P. Broadband magnetization transfer using moderate radio-frequency fields for NMR with very high static fields and spinning speeds. *Chemical Physics Letters* **488**, 10-16 (2010).
315. Scholz, I., Meier, B.H. & Ernst, M. NMR polarization transfer by second-order resonant recoupling: RESORT. *Chemical Physics Letters* **485**, 335-342 (2010).
316. Ramachandran, R., Ladizhansky, V., Bajaj, V.S. & Griffin, R.G. <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C rotational resonance width distance measurements in uniformly <sup>13</sup>C-labeled peptides. *J Am Chem Soc* **125**, 15623-15629 (2003).
317. Ramachandran, R., Lewandowski, J.R., van der Wel, P.C.A. & Griffin, R.G. Multipole-multimode Floquet theory of rotational resonance width experiments: C-13-C-13 distance measurements in uniformly labeled-solids. *Journal of Chemical Physics* **124**, - (2006).
318. Peng, X., Libich, D., Janik, R., Harauz, G. & Ladizhansky, V. Dipolar Chemical Shift Correlation Spectroscopy for Homonuclear Carbon Distance

- Measurements in Proteins in the Solid State: Application to Structure Determination and Refinement. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 359-369 (2008).
319. Grommek, A., Meier, B.H. & Ernst, M. Distance information from proton-driven spin diffusion under MAS. *Chemical Physics Letters* **427**, 404-409 (2006).
  320. Oas, T.G., Griffin, R.G. & Levitt, M.H. Rotary Resonance Recoupling of Dipolar Interactions in Solid- State Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **89**, 692-695 (1988).
  321. Akbey, U., Oschkinat, H. & van Rossum, B.J. Double-Nucleus Enhanced Recoupling for Efficient C-13 MAS NMR Correlation Spectroscopy of Per-deuterated Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 17054-+ (2009).
  322. Weingarth, M., Demco, D.E., Bodenhausen, G. & Tekely, P. Improved magnetization transfer in solid-state NMR with fast magic angle spinning. *Chemical Physics Letters* **469**, 342-348 (2009).
  323. Weingarth, M., Bodenhausen, G. & Tekely, P. Broadband Carbon-13 Correlation Spectra of Microcrystalline Proteins in Very High Magnetic Fields. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 13937-13939 (2009).
  324. Lewandowski, J.R., De Paepe, G., Eddy, M.T. & Griffin, R.G. N-15-N-15 Proton Assisted Recoupling in Magic Angle Spinning NMR. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 5769-5776 (2009).
  325. Lewandowski, J.R., De Paepe, G., Eddy, M.T., Struppe, J., Maas, W. & Griffin, R.G. Proton Assisted Recoupling at High Spinning Frequencies. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 9062-9069 (2009).
  326. Lange, A., Seidel, K., Verdier, L., Luca, S. & Baldus, M. Analysis of proton-proton transfer dynamics in rotating solids and their use for 3D structure determination. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 12640-12648 (2003).
  327. Tycko, R. Theory of Stochastic dipolar recoupling in solid-state nuclear magnetic resonance. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 6114-6121 (2008).
  328. Marin-Montesinos, I., Mollica, G., Carravetta, M., Gansmüller, A., Pileio, G., Bechmann, M., Sebald, A. & Levitt, M.H. Truncated dipolar recoupling in solid-state nuclear magnetic resonance. *Chemical Physics Letters* **432**, 572-578 (2006).
  329. Khaneja, N. & Niels Chr, N. Triple oscillating field technique for accurate distance measurements by solid-state NMR. *The Journal of Chemical Physics* **128**, 015103 (2008).
  330. Sun, B.Q., Costa, P.R. & Griffin, R.G. Heteronuclear Polarization Transfer by Radiofrequency-Driven Dipolar Recoupling under Magic-Angle-Spinning. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **112**, 191-198 (1995).



331. Baldus, M., Petkova, A.T., Herzfeld, J. & Griffin, R.G. Cross polarization in the tilted frame: assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Mol. Phys.* **95**, 1197-1207 (1998).
332. Brinkmann, A. & Levitt, M.H. Symmetry principles in the nuclear magnetic resonance of spinning solids: Heteronuclear recoupling by generalized Hartmann-Hahn sequences. *Journal of Chemical Physics* **115**, 357-384 (2001).
333. Gullion, T. & Schaefer, J. Rotational-Echo Double-Resonance NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **81**, 196-200 (1989).
334. Rienstra, C.M., Tucker-Kellogg, L., Jaroniec, C.P., Hohwy, M., Reif, B., McMahon, M.T., Tidor, B., Lozano-Perez, T. & Griffin, R.G. De novo determination of peptide structure with solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10260-10265 (2002).
335. Haeberlen, U. & Waugh, J.S. Coherent Averaging Effects in Magnetic Resonance. *Physical Review* **175**, 453 (1968).
336. Levitt, M.H., Oas, T.G. & Griffin, R.G. Rotary Resonance Recoupling in Heteronuclear Spin Pair Systems. *Isr. J. Chem.* **28**, 271-282 (1988).
337. Bardet, M., Gerbaud, G., Giffard, M., Doan, C., Hediger, S. & Le Pape, L. C-13 high-resolution solid-state NMR for structural elucidation of archaeological woods. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55**, 199-214 (2009).
338. Pérez, S. & Mackie, B. Structure and morphology of cellulose. <http://www.cermav.cnrs.fr> (2001).
339. Sticklen, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* **9**, 433-443 (2008).
340. Knox, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 308-313 (2008).
341. Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. & Youngs, H. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* **306**, 2206-2211 (2004).
342. Blanchette Robert, A., Nilsson, T., Daniel, G. & Abad, A. in *Archaeological Wood*, Vol. 225 141-174 (American Chemical Society, 1989).
343. Florian, M.L.E. in *Conservation of Marine Archaeological Objects*, Vol. 1. (ed. C. Pearson) 1 (Butterworth & Co., London; 1987).
344. Grattan, D.W. A practical comparative study of several treatments for waterlogged wood. *Studies in conservation* **27**, 124-136 (1982).
345. Grattan, D.W. in *Conservation of Marine Archaeological Objects*, Vol. 1. (ed. C. Pearson) 55 (Butterworth & Co., London; 1987).
346. Jensen, P. & Gregory, D.J. Selected physical parameters to characterize the state of preservation of waterlogged archaeological wood: a practical guide

- for their determination. *Journal of Archaeological Science* **33**, 551-559 (2006).
347. Grattan, D.W. & Clarke, R.W. in *Conservation of Marine Archaeological Objects Vol. 1.* (ed. C. Pearson) 164-206 (Butterworth & Co., London; 1987).
  348. *Archaeological Wood.* (American Chemical Society, Washington, DC; 1989).
  349. Cederlund, C.O. *Vasa I: The Archaeology of a Swedish Warship of 1628.* (2006).
  350. Westermarck, U., Steenberg, B. & Sundqvist, B. in *59th Appita Annual Conference and Exhibition : incorporating the 13th ISWFPC : proceedings (59th Appita Annual Conference and Exhibition : incorporating the 13th ISWFPC : proceedings Carlton, VIC : Appita, 2005).*
  351. Bardet, M., Lundquist, K., Parkas, J., Robert, D. & von Unge, S. C-13 assignments of the carbon atoms in the aromatic rings of lignin model compounds of the arylglycerol beta-aryl ether type. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**, 976-979 (2006).
  352. Bardet, M., Robert, D., Lundquist, K. & von Unge, S. Distribution of erythro and threo forms of different types of beta-O-4 structures in aspen lignin by C-13 NMR using the 2D INADEQUATE experiment. *Magnetic Resonance in Chemistry* **36**, 597-600 (1998).
  353. Ammalahti, E., Brunow, G., Bardet, M., Robert, D. & Kilpelainen, I. Identification of Side-Chain Structures in a Poplar Lignin Using Three-Dimensional HMQC-<sup>1</sup>H HOHAHA NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 5113-5117 (1998).
  354. Bardet, M., Foray, M.F. & Robert, D. Use of the Dept Pulse Sequence to Facilitate the C-13 Nmr Structural-Analysis of Lignins. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **186**, 1495-1504 (1985).
  355. Colombini, M.P., Orlandi, M., Modugno, F., Tolppa, E.L., Sardelli, M., Zoia, L. & Crestini, C. Archaeological wood characterisation by PY/GC/MS, GC/MS, NMR and GPC techniques. *Microchemical Journal* **85**, 164-173 (2007).
  356. Vanderhart, D.L. Influence of Molecular Packing on Solid-State C-13 Chemical-Shifts - the N-Alkanes. *Journal of Magnetic Resonance* **44**, 117-125 (1981).
  357. Bardet, M., Rousseau, A. & Vincendon, M. High-Resolution Solid-State-C-13 Cp/Mas Nmr-Study of Scleroglucan Hydration. *Magnetic Resonance in Chemistry* **31**, 887-892 (1993).
  358. Hediger, S., Emsley, L. & Fischer, M. Solid-state NMR characterization of hydration effects on polymer mobility in onion cell-wall material. *Carbohydrate Research* **322**, 102-112 (1999).

359. Earl, W.L. & VanderHart, D.L. High resolution, magic angle sampling spinning carbon-13 NMR of solid cellulose I. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 3251-3252 (1980).
360. Kono, H., Erata, T. & Takai, M. CP/MAS <sup>13</sup>C NMR Study of Cellulose and Cellulose Derivatives. 2. Complete Assignment of the <sup>13</sup>C Resonance for the Ring Carbons of Cellulose Triacetate Polymorphs. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 7512-7518 (2002).
361. Kono, H., Erata, T. & Takai, M. Complete Assignment of the CP/MAS <sup>13</sup>C NMR Spectrum of Cellulose III. *Macromolecules* **36**, 3589-3592 (2003).
362. Kono, H., Erata, T. & Takai, M. Determination of the Through-Bond Carbon-Carbon and Carbon-Proton Connectivities of the Native Celluloses in the Solid State. *Macromolecules* **36**, 5131-5138 (2003).
363. Atalla, R.H., Gast, J.C., Sindorf, D.W., Bartuska, V.J. & Maciel, G.E. Carbon-13 NMR spectra of cellulose polymorphs. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 3249-3251 (1980).
364. Kolodziejski, W., Frye, J.S. & Maciel, G.E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood. *Analytical Chemistry* **54**, 1419-1424 (1982).
365. Ghisalberti, E.L. & Godfrey, I.M. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the analysis of organic archaeological materials. *Studies in conservation* **43**, 215-230 (1998).
366. Lambert, J.B., Shawl, C.E. & Stearns, J.A. Nuclear magnetic resonance in archaeology. *Chemical Society Reviews* **29**, 175-182 (2000).
367. Paci, M., Federici, C., Capitani, D., Perenze, N. & Segre, A.L. Nmr-Study of Paper. *Carbohydrate Polymers* **26**, 289-297 (1995).
368. Bardet, M., Foray, M.F., Maron, S., Goncalves, P. & Tran, Q.K. Characterization of wood components of Portuguese medieval dugout canoes with high-resolution solid-state NMR. *Carbohydrate Polymers* **57**, 419-424 (2004).
369. Bardet, M., Foray, M.F. & Tran, Q.K. High-resolution solid-state CPMAS NMR study of archaeological woods. *Analytical Chemistry* **74**, 4386-4390 (2002).
370. Bardet, M., Gerbaud, G., Tran, Q.K. & Hediger, S. Study of interactions between polyethylene glycol and archaeological wood components by C-13 high-resolution solid-state CP-MAS NMR. *Journal of Archaeological Science* **34**, 1670-1676 (2007).
371. Burns, S.T., Wu, X.L. & Zilm, K.W. Improvement of spectral editing in solids: A sequence for obtaining (CH)-C-13+(CH<sub>2</sub>)-C-13-only C-13 spectra. *Journal of Magnetic Resonance* **143**, 352-359 (2000).

372. Jehle, S., Hiller, M., Rehbein, K., Diehl, A., Oschkinat, H. & van Rossum, B.J. Spectral editing: selection of methyl groups in multidimensional solid-state magic-angle spinning NMR. *Journal of Biomolecular Nmr* **36**, 169-177 (2006).
373. Lopes, M.H., Sarychev, A., Neto, C.P. & Gil, A.M. Spectral editing of C-13 CP/MAS NMR spectra of complex systems: application to the structural characterisation of cork cell walls. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **16**, 109-121 (2000).
374. Newman, R.H. & Condon, L.M. Separating Subspectra from Cross-Polarization Magic-Angle-Spinning Nuclear-Magnetic-Resonance Spectra by Proton Spin Relaxation Editing. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **4**, 259-266 (1995).
375. Peng, J. & Frydman, L. Spectral Editing in Solid-State Mas Nmr Using Chemical-Shift-Anisotropy-Dephasing Techniques. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **113**, 247-250 (1995).
376. Rossi, P., Subramanian, R. & Harbison, G.S. Methylene-only subspectra in C-13 CPMAS using a new double quantum filtering sequence. *Journal of Magnetic Resonance* **141**, 159-163 (1999).
377. Rybaczewski, E.F., Neff, B.L., Waugh, J.S. & Sherfinski, J.S. High-Resolution C-13 Nmr in Solids - C-13 Local Fields of CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub>. *Journal of Chemical Physics* **67**, 1231-1236 (1977).
378. Schmidt-Rohr, K. & Mao, J.D. Efficient CH-group selection and identification in C-13 solid-state NMR by dipolar DEPT and H-1 chemical-shift filtering. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 13938-13948 (2002).
379. Smernik, R.J., Oliver, I.W. & Merrington, G. Advanced solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of sewage sludge organic matter: Detection of organic "domains". *Journal of Environmental Quality* **32**, 1523-1533 (2003).
380. Tang, H.R., Wang, Y.L. & Belton, P.S. C-13 CPMAS studies of plant cell wall materials and model systems using proton relaxation-induced spectral editing techniques. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **15**, 239-248 (2000).
381. Tekely, P., Brondeau, J., Retournard, A. & Canet, D., Vol. 27 696-698 (John Wiley & Sons, Ltd., 1989).
382. Webb, G.G. & Zilm, K.W. Asynchronous Magic Angle Spectroscopy - a Convenient Method for Assigning Solid-State C-13 Cpmas Spectra. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 2455-2463 (1989).
383. Bielecki, A., Kolbert, A.C. & Levitt, M.H. Frequency-Switched Pulse Sequences - Homonuclear Decoupling and Dilute Spin Nmr in Solids. *Chemical Physics Letters* **155**, 341-346 (1989).

384. Kim, Y.S. & Newman, R.H. Solid State  $^{13}\text{C}$  NMR Study of Wood Degraded by the Brown Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Holzforschung* **49**, 109-114 (2009).
385. Liitia, T., Maunu, S.L., Hortling, B., Tamminen, T., Pekkala, O. & Varhimo, A. Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state NMR spectroscopic methods. *Cellulose* **10**, 307-316 (2003).
386. Liitia, T., Maunu, S.L., Sipila, J. & Hortling, B. Application of solid-state C-13 NMR spectroscopy and dipolar dephasing technique to determine the extent of condensation in technical lignins. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **21**, 171-186 (2002).
387. Newman, R.H. & Hemmingson, J.A. Determination of the Degree of Cellulose Crystallinity in Wood by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Holzforschung* **44**, 351-356 (2009).
388. Wu, X.L. & Zilm, K.W. Methylene-Only Subspectrum in Cpmas Nmr. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **104**, 119-122 (1993).
389. Wu, X.L. & Zilm, K.W. Complete Spectral Editing in Cpmas Nmr. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **102**, 205-213 (1993).
390. Opella, S.J. & Frey, M.H. Selection of Non-Protonated Carbon Resonances in Solid-State Nuclear Magnetic-Resonance. *Journal of the American Chemical Society* **101**, 5854-5856 (1979).
391. Wu, X.L., Burns, S.T. & Zilm, K.W. Spectral Editing in Cpmas Nmr - Generating Subspectra Based on Proton Multiplicities. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **111**, 29-36 (1994).
392. Hu, J.Z., Harper, J.K., Taylor, C., Pugmire, R.J. & Grant, D.M. Modified spectral editing methods for C-13 CP/MAS experiments in solids. *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 326-330 (2000).
393. Sakellariou, D., Lesage, A. & Emsley, L. Spectral editing in solid-state NMR using scalar multiple quantum filters. *Journal of Magnetic Resonance* **151**, 40-47 (2001).
394. Lesage, A., Steuernagel, S. & Emsley, L. Carbon-13 spectral editing in solid-state NMR using heteronuclear scalar couplings. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 7095-7100 (1998).
395. Bardet, M., Emsley, L. & Vincendon, M. Two-dimensional spin-exchange solid-state NMR studies of C-13-enriched wood. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **8**, 25-32 (1997).
396. Bardet, M., Gagnaire, D., Nardin, R., Robert, D. & Vincendon, M. Use of  $^{13}\text{C}$  enriched wood for structural NMR investigation of wood and wood components, cellulose and lignin, in solid and in solution. *Holzforschung* **40**, pp 17-24 (1986).
397. Maunu, S.L. NMR studies of wood and wood products. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **40**, 151-174 (2002).



## Résumé

La RMN en phase solide est une méthode non négligeable lors de l'étude d'échantillons biologiques. Nous avons ainsi pu étudier le peptidoglycane et les acides téichoïques, composants essentiels de la paroi cellulaire bactérienne. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à leur organisation, à leur flexibilité et à leur interaction avec les cations. Nous avons également étudié les interactions entre les acides téichoïques et une protéine responsable de la virulence des pneumocoques. Cet exemple illustre parfaitement le manque de sensibilité des expériences de RMN ainsi que les limites des techniques actuelles de recouplage. Nous avons alors mis en évidence un phénomène permettant d'accélérer l'acquisition des spectres. Nous avons aussi travaillé à l'amélioration des séquences de recouplage PAR et PAIN-CP. Finalement, nous avons comparé des méthodes d'édition spectrale appliquées au bois, très étudié dès les débuts de la RMN en phase solide.

## Abstract

Solid-state NMR is a well-suited method for the study of biological samples. Thanks to this technique, we could study the peptidoglycan and the teichoic acids, essential components of the bacterial cell wall. We were especially interested in their organization, their flexibility and their interactions with cations. We also studied the interactions between the teichoic acids and a protein involved in the pneumococcal virulence. This example illustrates perfectly the lack of sensitivity of the NMR experiments and the limits of the existing recoupling sequences. We highlighted a phenomenon allowing the faster acquisition of NMR spectra. We also worked on the improvement of the PAR and PAIN-CP recoupling sequences. Finally, we compared spectral editing methods applied to wood samples, very well studied since the beginning of solid-state NMR.

---

**Mots-clés :** RMN en phase solide, paroi cellulaire bactérienne, peptidoglycane, acides téichoïques, protéine, relaxation longitudinale, diffusion de spin, excitation sélective, recouplage, bois archéologiques.

**Key words:** Solid-state NMR, bacterial cell wall, peptidoglycan, teichoic acids, protein, longitudinal relaxation, spin diffusion, selective excitation, recoupling, archaeological wood.